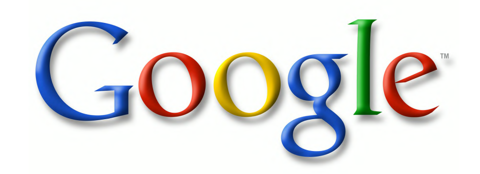




THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

M. AUGUSTE FERNBACH

1re THÈSE. — Recherches sur la sucrase, diastase inversive du sucre de canne.

2e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le décembre, devant la Commission d'examen.

MM. FRIEDEL, *Président.*
DUCLAUX, LIPPMANN, *Examinateurs.*

SCEAUX

IMPRIMERIE CHARAIRE ET FILS

1890

A Monsieur Ed. Grimaux
Professeur à l'École Polytechnique et à l'Institut Agronomique
Souvenir bien respectueux,
A Fernbach

Série A, n° 146.
N° D'ORDRE
703

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

M. AUGUSTE FERNBACH

1re THÈSE. — Recherches sur la sucrase, diastase inversive du sucre de canne.

2e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

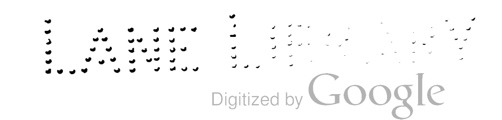
Soutenues le 26 décembre, devant la Commission d'examen.

MM. FRIEDEL, *Président.*
DUCLAUX, LIPPMANN, } *Examinateurs.*

SCEAUX

IMPRIMERIE CHARAIRE ET FILS

1890



ACADÉMIE DE PARIS

FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

	MM	
DOYEN....................	DARBOUX, professeur..	Géométrie supérieure.
PROFESSEURS HONORAIRES,	PASTEUR.	
	DUCHARTRE.	
PROFESSEURS	DE LACAZE-DUTHIERS.	Zoologie, Anatomie, Physiologie comparée.
	HERMITE..............	Algèbre supérieure.
	TROOST...............	Chimie.
	FRIEDEL..............	Chimie organique.
	O. BONNET............	Astronomie.
	TISSERAND...........	Astronomie.
	LIPPMANN............	Physique.
	HAUTEFEUILLE........	Minéralogie.
	BOUTY................	Physique.
	APPELL...............	Mécanique rationnelle.
	DUCLAUX.............	Chimie biologique.
	BOUSSINESQ..........	Mécanique physique et expérimentale.
	PICARD...............	Calcul différentiel et Calcul intégral.
	POINCARÉ............	Calcul des probabilités, Physique mathématique.
	Yves DELAGE.........	Zoologie, Anatomie, Physiologie comparée.
	BONNIER..............	Botanique.
	DASTRE...............	Physiologie.
	DITTE................	Chimie.
	N....................	Géologie.
PROFESSEURS ADJOINTS....	WOLF.................	Physique céleste.
	CHATIN...............	Zoologie, Anatomie, Physiologie comparée.
	JOLY.................	Chimie.
SECRÉTAIRE..............	PHILIPPON.	

A MONSIEUR DUCLAUX

MEMBRE DE L'INSTITUT

PROFESSEUR

A LA FACULTÉ DES SCIENCES ET A L'INSTITUT AGRONOMIQUE

Hommage de reconnaissance et de profond dévouement.

PREMIÈRE THÈSE

RECHERCHES SUR LA SUCRASE, DIASTASE INVERSIVE DU SUCRE DE CANNE

INTRODUCTION

APERÇU DE L'ÉTAT ACTUEL DE NOS CONNAISSANCES

SUR LES DIASTASES

Les faits nombreux qu'une science accumule à ses débuts peuvent rarement, lorsqu'on les examine plus tard d'un peu près, rester complètement d'accord avec les observations nouvelles dont elle s'enrichit peu à peu ; il arrive un moment où l'étude des faits anciens doit être reprise à la lumière des notions récentes, parce qu'on a chance, dans cette revision, de faire disparaître des contradictions apparentes et d'élucider des points qu'on s'était contenté jusque-là de noter en passant et qu'on avait laissés sans explication. L'ensemble de nos connaissances sur les diastases n'échappe pas à cette loi générale ; les nombreux travaux dont l'étude de ces corps singuliers a fourni la matière sont bien d'accord lorsqu'il s'agit de décrire les propriétés générales de chaque diastase ; mais si l'on cherche à pénétrer dans le détail du mode d'action de ces substances, on trouve une foule d'affirmations contradictoires, non seulement quand on passe d'un auteur à l'autre, mais souvent chez un même auteur.

C'est qu'en effet il n'y a point de terrain d'études plus mouvant que celui que nous présentent les diastases, et les contradictions que nous rencontrons ne sont pas imputables aux auteurs des travaux publiés sur ce sujet, mais bien au sujet lui-même. C'est là ce que je voudrais essayer de montrer ici, me proposant moins de faire un résumé des travaux auxquels les diastases ont

donné lieu, que de faire ressortir, en examinant quelques points particuliers de ces travaux, la nécessité de la revision dont je parlais tout à l'heure. Il nous suffit pour cela de passer en revue quelques-unes des propriétés générales des diastases, en insistant sur les données qui paraissent le moins nettement établies et qui peuvent, par là même, prêter matière à des assertions contradictoires.

Une des grandes difficultés que présente l'étude des diastases, c'est l'impossibilité de préparer ces corps à l'état de pureté. Pour faire voir nettement cette impossibilité, que bien des esprits ont de la peine à admettre, nous n'avons qu'à examiner rapidement les divers procédés de préparation qui ont été mis en œuvre. Tous ces procédés reposent sur une propriété commune à toutes les diastases : elles se fixent comme une teinture sur les particules en suspension dans les liquides diastasifères, et sont entraînées par les précipités qu'on produit au sein de ces liquides, surtout lorsque ces précipités sont très finement divisés et amorphes. C'est ainsi que MM. Wurtz et Bouchut ont observé que la fibrine, mise en suspension dans une solution de papaïne et lavée ensuite à l'eau, se digère elle-même dans de l'eau acidulée, en abandonnant de la papaïne à cette eau (2). La seule chose qui varie d'une méthode de préparation à l'autre, c'est le procédé employé pour produire le précipité qui entraîne la diastase. La méthode la plus ancienne et la plus répandue consiste à traiter le liquide diastasifère par un excès d'alcool; employé par Payen pour la préparation de l'amylase et de la pepsine, par M. Berthelot pour la sucrase (1), par MM. Wurtz et Bouchut pour la papaïne, tout récemment par MM. O'Sullivan et Tompson pour la sucrase (12), l'alcool a servi à M. Dubrunfaut à purifier l'amylase ou diastase du malt, et a été appliqué par d'autres savants à la purification d'un grand nombre de diastases. En précipitant l'extrait de malt par son volume d'alcool à 90°, M. Dubrunfaut a obtenu un précipité très azoté et peu actif; une seconde précipitation par un nouveau volume d'alcool à 90° fournit la majeure partie de l'amylase. On élimine ainsi, en grande partie, les matières azotées qui accompagnent la diastase; mais ce procédé de précipitations successives par l'alcool, qui a réussi pour l'amylase et peut fort bien ne donner que des résultats médiocres avec d'autres diastases, a en outre le grave

inconvénient de faire perdre une grande quantité de matière active, même lorsqu'on a la précaution de ne laisser la diastase précipitée que très peu de temps en contact avec l'alcool; c'est là un fait qui a été surtout constaté par M. Duclaux (4) à propos de la présure. Séchées avec précaution à température basse et dans le vide, les diastases ainsi précipitées par l'alcool se conservent beaucoup mieux qu'en solution; leur conservation est également facilitée par l'emploi du procédé appliqué par Von Wittich (5) à la préparation de la pepsine, procédé dont Claude Bernard (6) s'est servi pour extraire l'amylase du foie, et qui consiste à dissoudre la diastase dans la glycérine; on isole facilement la diastase de la solution ainsi obtenue en la précipitant par l'alcool.

Dans les autres méthodes de préparation, on enlève la diastase au précipité qui l'a entraînée avec lui en traitant ce précipité par l'eau, ou bien on traite le précipité par un dissolvant convenable qui laisse la diastase à l'état insoluble. Telle est la méthode de Wassmann, qui consiste à traiter la liqueur par l'acétate de plomb; celle de Cohnheim, qui acidifie la liqueur par l'acide phosphorique et précipite ensuite cet acide par l'eau de chaux à l'état de phosphate tribasique de chaux; celle employée pour la pepsine par Brücke (7), qui agite la liqueur avec une solution éthéro-alcoolique de cholestérine, et redissout ensuite la cholestérine dans l'éther; celle de Danilewski (8), qui obtient le même résultat par l'emploi du collodion.

En somme, quel que soit le procédé employé, on voit que la diastase obtenue est toujours mélangée d'une quantité plus ou moins notable de matière étrangère dont on ne peut l'extraire, parce que la formation du précipité qui entraîne la diastase exige la présence d'une substance précipitable autre que la diastase elle-même; et comme on ne peut pas savoir, dans la série des traitements successifs, à quel moment cette matière étrangère est éliminée, il est clair qu'on ne peut que se rapprocher plus ou moins de l'état de pureté absolue sans être jamais sûr de l'atteindre. D'ailleurs, pendant ces traitements successifs, la diastase se détruit en proportion de plus en plus grande : il semble que sa fragilité va en augmentant à mesure qu'elle se purifie, fait que MM. O'Sullivan et Tompson viennent de constater une fois de plus pour la sucrase.

De ces constatations diverses résulte une première incertitude sur l'identité parfaite des substances obtenues dans diverses préparations, conduites en apparence exactement de la même manière, identité sur laquelle on demanderait vainement à l'analyse chimique de nous fournir des renseignements. C'est ainsi qu'on trouve dans la science les chiffres les plus variables pour la composition centésimale des diastases, de telle sorte qu'on est conduit à conclure avec Ad. Mayer (10) que les diastases se rapprochent beaucoup des matières albuminoïdes, mais que rien n'indique jusqu'ici qu'on doive les considérer comme des combinaisons chimiques nettement définies.

Les diastases ne pouvant être séparées à l'état de pureté des liquides qui les renferment, et cette séparation ne pouvant d'ailleurs se faire qu'avec une perte très notable de la matière active, on est conduit à employer, pour apprécier leur quantité une méthode de mesure détournée, fondée sur la détermination de la quantité de matière qu'elles sont capables de transformer. Si l'on appelle q la quantité de matière transformée, d la quantité de diastase employée pour opérer cette transformation et t le temps nécessaire pour la produire, on peut représenter l'action de la diastase pour la formule générale

$$q = A\, d\, t,$$

dans laquelle A représente une constante que nous aurons à examiner tout à l'heure. Cette formule résume celles des propriétés générales des diastases qui sont les mieux connues; elle montre que toutes choses égales d'ailleurs, la quantité de matière transformée est proportionnelle au temps pendant lequel la diastase a agi, ou, pour un même temps, à la quantité de diastase employée. Les quantités de diastase employées pour transformer une même quantité de matière sont donc inversement proportionnelles aux temps pendant lesquels elles agissent.

Si en pratique l'action des diastases était aussi simple que l'indique la formule, leur mesure serait chose facile au moins pour quelques-unes d'entre elles : il suffirait d'avoir à sa disposition un procédé de dosage précis de la matière transformée. Mais les choses sont loin de se passer avec cette simplicité. Tout d'abord la formule n'est exacte que lorsque d ou t varient entre

certaines limites. Pour la présure en particulier, ces limites sont assez étendues; mais lorsque la quantité de présure va en décroissant beaucoup, le temps nécessaire à la coagulation augmente beaucoup plus, et inversement, lorsqu'on augmente cette quantité, le temps diminue beaucoup moins que ne l'indiquerait la formule. Pour la sucrase, les limites entre lesquelles la loi se vérifie sont plus rapprochées, sans doute parce que la quantité de matière transformée, le sucre interverti, est plus facile à apprécier avec précision que pour la présure dont l'action ne se traduit que par le phénomène grossier de la coagulation. Il faut d'ailleurs, remarquer que le produit de l'action de la présure disparaît du liquide où elle agit sous la forme insoluble tandis que le sucre interverti par la sucrase s'y accumule peu à peu, et c'est là une circonstance qui restreint notablement les limites dans lesquelles la proportionnalité de l'action au temps est exacte. M. Duclaux a reconnu, en effet, que les quantités de sucre interverti par une même dose de sucrase ne sont proportionnelles à la durée de l'action qu'autant que la quantité de sucre interverti ne s'élève pas à plus d'un huitième du sucre total présent à l'origine. A partir du moment où la quantité de sucre interverti atteint cette dose, l'interversion va en se ralentissant de plus en plus. L'expérience montre nettement que c'est bien la présence de la matière transformée qui produit ce retard; j'ai réussi, comme on le verra dans la suite de ce travail, à montrer qu'il y a de ce retard une autre cause importante, l'oxydation de la diastase, dont j'aurai à parler tout à l'heure [1].

1. Toute la première partie de ce travail a paru en trois mémoires successifs dans les *Annales de l'Institut Pasteur*, en 1889 et janvier 1890. MM. O'Sullivan et Tompson, qui ont publié tout récemment un mémoire sur l'*invertase* ou sucrase de la levure (octobre 1890), ne semblent avoir eu connaissance ni de ces publications ni des faits que M. Duclaux a exposés relativement à la sucrase dans sa *Microbiologie*, en 1883. Ils annoncent entre autres, que la présence du sucre interverti n'a aucune influence sur la marche de l'interversion. Il me semble qu'ils ne se sont pas toujours mis en garde contre l'oxydabilité de la sucrase, bien que la plupart de leurs expériences d'interversion aient été faites en présence d'acide, conditions qui empêchent l'oxydation. Je trouve chez ces auteurs une confirmation précieuse des faits que j'ai mis en lumière, et que je reproduis dans ce travail, relativement à l'influence de doses faibles d'acide sur l'interversion. Mais je dois faire quelques réserves pour l'emploi de l'acide sulfurique, le seul dont ils aient étudié l'influence. La dose de cet acide qui favorise le plus l'interversion est, en effet, tellement faible, qu'il est difficile de la déterminer avec précision; et d'ailleurs, en employant, comme ils l'ont fait, une sucrase qui renferme une proportion notable de matières minérales, on ne peut pas être sûr d'opérer en présence de la totalité de l'acide ajouté et en présence de cet acide seul. (Voir à ce sujet les raisons qui m'ont déterminé à employer l'acide acétique, p. 21 et 34.)

La proportionnalité aux quantités et au temps qui n'existe qu'entre certaines limites, ne se manifeste d'ailleurs qu'à une certaine température. Cette température est variable d'une diastase à l'autre, mais pour une même diastase elle est, ou du moins paraît nettement déterminée. Si, en effet, on étudie les quantités de matière qu'une même dose de liquide diastasifère est capable de transformer dans le même temps à différentes températures, on voit que ces quantités vont d'abord en croissant jusqu'à un maximum, correspondant à une certaine température, puis en décroissant. Cette température optimum est située pour la présure à 41°; pour la sucrase au voisinage de 56°; pour la pepsine, vers 50°. L'amylase seule présente une anomalie curieuse : la vitesse de transformation de l'amidon par cette diastase présente bien un optimum, situé à 70° environ, mais à cette température les proportions de maltose et de dextrine formés ne sont pas les mêmes qu'aux températures inférieures, et d'une manière générale le rapport du maltose à la dextrine va en diminuant à mesure que la température s'élève.

Cette considération de la température nous ramène à l'examen de la constante A dans notre formule. Le terme A comprend en effet cette condition de température optimum, mais en dehors de cette condition, il en renferme implicitement un certain nombre d'autres, fort mal définies, dont quelques-unes ont été vaguement entrevues et dont les autres nous sont totalement inconnues. Les réactions mutuelles de ces conditions diverses, intimement liées les unes aux autres, mettent l'action d'une diastase sous la dépendance si directe d'influences considérées jusqu'ici comme négligeables, que les faits qui paraissaient le plus solidement établis semblent sujets à caution. Ce qui prouve bien que des conditions plus délicates que celles dont j'ai parlé jusqu'ici, et dont nous sommes maîtres dans une certaine mesure, entrent en jeu dans le phénomène, c'est la discordance des résultats relatifs à l'optimum de température pour les diverses diastases. C'est ainsi que M. Kjeldahl (9) et M. Duclaux ont observé que la température optimum pour l'invertine ou sucrase est située à 56° environ, tandis que Ad. Mayer indique une température beaucoup moins élevée, et, de plus, variable d'une série d'expériences à l'autre. Le même auteur, étudiant la température de destruction des

diastases, trouve également des chiffres variables, inférieurs en général à ceux qui ont été indiqués par d'autres; il rapporte, il est vrai, fort justement, mais sans preuve expérimentale directe, la discordance de ces résultats à la présence de matières étrangères. Notons en passant un fait intéressant signalé par Ad. Mayer, et dont on ne trouve l'indication que chez lui : les diastases qui sont détruites à des températures bien inférieures à 100° lorsqu'on chauffe leurs solutions, résistent au contraire à 100° et même à des températures légèrement supérieures lorsqu'on les chauffe à l'état sec. C'est là une constatation importante, qui établit un point de rapprochement de plus entre les diastases et les microbes, avec lesquels elles partageaient déjà un grand nombre de propriétés. Cette observation est d'ailleurs d'accord avec la pratique du touraillage du malt, opération dans laquelle le grain d'orge et la diastase qu'il renferme sont portés quelquefois à des températures de 120 et 125°, sans que l'amylase disparaisse totalement, comme l'a montré récemment M. Kayser (11). Mais ce résultat ne peut être atteint que si le malt a été chauffé très lentement et à température basse jusqu'au moment où il est parfaitement sec.

Il semble donc, en voyant les résultats contradictoires que j'ai mentionnés tout à l'heure, qu'il faille les imputer à l'intervention d'influences méconnues jusqu'ici. Il y a d'abord une cause d'erreur qui joue un rôle considérable dans les phénomènes auxquels les diastases donnent lieu : c'est l'intervention des microbes, qui peut devenir très active dans des expériences prolongées au delà de quelques heures, et contre laquelle on ne s'est pas toujours mis en garde. Quelques auteurs l'ont bien soupçonnée, mais ne se sont pas rendu un compte exact de son importance. Ainsi, MM. Wurtz et Bouchut, dans leurs expériences de digestion de fibrine par la papaïne, constatent bien que l'exactitude de certains de leurs résultats est infirmée par la présence de microbes de la putréfaction révélant leur présence par l'odeur des gaz dégagés; mais il est certain que l'influence de leur intervention avait dû se faire sentir bien avant que l'odeur la révélât, et c'est peut-être là une des raisons qui, en faisant de la papaïne une diastase qui agit aussi bien en milieu alcalin qu'en milieu acide, nous la montrent comme une exception unique, occupant une place à part dans le monde des diastases.

M. Duclaux a montré dans sa *Microbiologie* ce qu'il faut faire pour se soustraire à cette grave cause d'erreur et a recommandé l'emploi des filtres en porcelaine pour obtenir un liquide diastasifère qui soit sûrement débarrassé de microbes. C'est là une méthode précieuse qui rend de grands services pour la stérilisation des liquides; mais, avant de l'appliquer à l'étude d'une diastase il faut s'assurer que cette diastase n'est pas retenue par le filtre, et préciser les conditions dans lesquelles elle le traverse. Je montrerai, en effet, que parmi les sucrases de diverses origines, il y en a que le filtre retient intégralement ou partiellement, et d'autres qui le traversent en totalité, même lorsqu'on opère dans des conditions comparables. A défaut de cette méthode de filtration, on pourra s'opposer à l'envahissement des microbes par l'addition d'un antiseptique, pourvu qu'on se soit tout d'abord assuré que cet antiseptique, à la dose qu'on emploie, est sans influence sur l'action de la diastase elle-même. M. Muntz a depuis longtemps montré que le chloroforme n'entrave nullement l'action des diastases, à des doses où il empêche toute manifestation de la vie (3). Il sera également possible dans certaines circonstances, et ce sera là un procédé préférable à tous, d'obtenir directement un liquide diastasifère absolument stérile.

Cette influence de l'intervention des microbes étant mise de côté, parce que son rôle dans tous les phénomènes de la chimie biologique a été assez nettement mis en lumière pour qu'elle n'échappe plus à un observateur consciencieux, nous pouvons passer à l'examen des autres causes d'erreur beaucoup plus importantes au point de vue où nous nous sommes placés. M. Duclaux a montré l'influence que des quantités minimes de différents sels peuvent avoir sur l'action de la présure et de la sucrase; M. Petit a fait la même étude pour la pepsine. Ces influences sont accélératrices pour certains sels et retardatrices pour d'autres; mais il arrive que pour un même sel les doses faibles favorisent l'action et les doses fortes l'entravent, ou inversement. Le rôle de l'acidité ou de l'alcalinité est encore plus important à considérer et cependant il n'a été examiné de très près que pour quelques diastases. On sait que l'acidité du milieu favorise et l'alcalinité retarde l'action de la présure, de la sucrase, de l'amylase, de la pepsine; que la pancréatine agit mieux, au contraire, en milieu alcalin qu'en milieu acide; que la papaïne est, comme je

l'ai dit plus haut et avec les réserves que j'ai faites, indifférente à la réaction du liquide. De plus, les recherches de M. Kjeldahl sur l'invertine et sur l'amylase ont montré que la dose d'acide la plus favorable est toujours très faible et que, lorsqu'on dépasse cette dose, l'acide a pour effet de retarder l'action de la diastase. M. Duclaux a vu, d'autre part, que l'action de la sucrase varie peu pour des doses variables de divers acides, et que l'action spécifique de l'acide disparaît derrière le caractère prédominant de l'acidité. On voit bien par là que le rôle de la réaction du milieu, bien qu'il n'ait pas été méconnu, n'a pas été examiné avec la précision qu'il comportait. C'est là, en effet, comme je le montrerai dans les pages qui suivent, l'une des causes les plus importantes d'incertitude qu'on puisse rencontrer dans l'action d'une diastase, et l'on conçoit aisément que cette circonstance ait pu passer presque inaperçue, parce que c'est au voisinage de la neutralité, c'est-à-dire précisément au point où les réactifs précis font le plus défaut, que l'influence des acides ou des bases est la plus notable.

Les quelques indications qui précèdent font voir comment l'action d'une diastase va en se compliquant de plus en plus à mesure qu'on saisit mieux les causes dont elle dépend. J'ai dit plus haut que toutes ces influences avaient entre elles des relations étroites qui font qu'elles réagissent les unes sur les autres; nous allons voir ces réactions mutuelles entrer en jeu en examinant une nouvelle cause d'incertitude qui tient à la fragilité même des diastases. Leur instabilité est un fait reconnu par tous les expérimentateurs; j'ai indiqué plus haut les contradictions qu'on trouve dans la science au sujet de la résistance à la chaleur; mais les phénomènes qui président à la destruction de ces corps n'ont fait l'objet d'aucune remarque spéciale. M. Duclaux seul a montré, en prenant pour exemple la présure et la sucrase, avec quelle facilité ces substances s'oxydent et combien l'action de la lumière favorise cette oxydation. Les conditions qui peuvent favoriser ou retarder cette oxydation à l'obscurité ou à la lumière restent cependant inconnues, car l'action de la lumière est, contrairement aux expériences de M. Duclaux, considérée par Ad. Mayer comme nulle pour toutes les diastases sauf la présure. C'est là une lacune importante dans nos connaissances; des renseignements sur les circonstances qui peuvent rendre

cette oxydation des diastases difficile ou impossible sont cependant indispensables, car tout essai dans lequel l'expérimentateur ne sait rien sur l'absence ou la présence de cette cause de destruction devient par là même sujet à caution. Je me suis occupé d'élucider avec soin, dans le travail qui suit, ce point obscur et c'est en l'examinant que j'ai vu les relations étroites qui lient l'oxydabilité à la réaction du milieu, réaction qui influe ellemême sur l'activité de la diastase. Ainsi pour la sucrase, les bases ont une influence retardatrice non seulement à cause de la réaction qu'elles amènent dans la liqueur, mais encore parce que cette réaction facilite singulièrement la destruction de la diastase.

En insistant sur ces diverses causes d'incertitude, qui nécessitent, comme je le disais en commençant, une sorte de revision de nos connaissances sur les diastases, je ne crois pas cependant les avoir énumérées toutes. En comparant la grandeur des effets observés dans certains cas à la petitesse des causes, nous sommes forcément conduit à cette conclusion que l'action des diastases doit être encore soumise à des influences perturbatrices insaisissables, et que toutes les expériences qu'on pourra faire sur ces corps ne seront jamais soustraites d'une manière absolue à ces causes de perturbation. Mais les exemples que j'ai cités suffisent pour mettre notre prudence en éveil, en nous faisant prévoir les difficultés qu'on rencontrerait dans la revision dont je viens de parler; nous n'aurons chance d'atteindre notre but qu'en proportionnant la sensibilité de nos moyens d'investigation à la délicatesse des phénomènes que nous voulons étudier.

BIBLIOGRAPHIE

DES TRAVAUX CITÉS DANS L'INTRODUCTION

1. Berthelot, *Comptes rendus*, t. 50 (1860).
2. Wurtz et Bouchut, *Comptes rendus*, t. 86, 100 et 101.
3. Muntz, *Comptes rendus*, t. 80, p. 1250.
4. Duclaux, *Microbiologie*, p. 120 à 199.
5. Von Wittich, *Archiv der gesammten Physiologie*, t. 3, p. 339.
6. Claude Bernard, *Leçons sur la digestion*.
7. Brucke, *Zeitschrift für Chemie*, t. 10 (1871).
8. Danilewski, *Virchow's Archiv*, t. 25, p. 279.
9. Kjeldahl, *Medelelser fra Carlsberg Laboratoriet*, 1879 et 1881.
10. Ad. Mayer, *Die Lehre von den chemischen Fermenten oder Enzymologie*, Heidelberg, 1882,
11. Kayser, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1890, p. 484.
12. O'Sullivan et Tompson, *Journal of the Chemical Society*, 1890, p. 835.

PREMIÈRE PARTIE

LA SUCRASE DE L'ASPERGILLUS NIGER

I

SUR QUELQUES PROPRIÉTÉS DE LA SUCRASE DE L'ASPERGILLUS NIGER.

J'ai essayé de faire ressortir, dans les pages qui précèdent, toute l'importance que présente l'étude des diatases, en montrant particulièrement les points sur lesquels nous n'avons pas de données solidement établies. Avant de passer à l'exposé de quelques faits nouveaux que je crois avoir mis en lumière, je voudrais poser dans ses lignes générales le problème que j'ai cherché à résoudre en partie.

Le rôle des diastases et des phénomènes qu'elles provoquent prend de jour en jour un intérêt plus grand, surtout depuis que les recherches de MM. Roux et Yersin[1] nous ont appris qu'il peut y avoir des diastases pathogènes. On peut se proposer de faire un pas de plus dans l'étude de ces substances, et de préciser ce que nous en savons en introduisant dans la science la notion de quantité de diastase, qui fait presque complètement défaut. A peine peut-on citer, dans cet ordre d'idées, quelques travaux récents, parmi lesquels je mentionnerai ceux de M. Kjeldahl sur la formation de l'amylase pendant la germi-

1. *Annales de l'Institut Pasteur,* 1888, p. 629; 1889, p. 273; 1890, p. 385.

nation de l'orge[1], de M. Dubourg sur l'amylase de l'urine[2], de MM. O'Sullivan et Tompson sur la sucrase de la levure (*loc. cit.*). Encore s'est-on contenté dans ces recherches d'apprécier les proportions relatives de la diastase étudiée, mais on n'a point cherché, à ma connaissance, à faire de mesure précise des quantités absolues de diastase. On conçoit cependant l'importance qu'il y aurait à pouvoir mesurer avec précision la marche de la sécrétion d'une diastase par un microbe aux différentes périodes de son développement, et à étudier toutes les influences que l'action de cette diastase peut subir.

Ce problème peut-il être résolu, même partiellement? C'est là une question à laquelle il est difficile de répondre dans l'état actuel de nos connaissances. Ce que je voudrais simplement montrer au début de ce travail, c'est que la solution du problème dépend d'un certain nombre de conditions dont l'importance a été méconnue de la plupart des expérimentateurs, et que de là résulte qu'on peut conserver quelques doutes, non pas, peut-être, sur leurs conclusions générales, mais sur certains faits particuliers assez nombreux pour exiger, comme je l'ai montré plus haut, une sorte de revision de la science.

Étant donnée l'impossibilité d'isoler les diastases à l'état de pureté, la seule méthode de dosage qu'on puisse mettre en œuvre consiste à faire agir le liquide diastasifère sur la matière qu'il est capable de transformer; dosant ensuite la quantité de matière transformée, on prend le nombre trouvé pour mesure de la quantité de diastase. Mais pour que les nombres ainsi obtenus soient comparables, il faut que les expériences aient été faites dans des conditions absolument identiqnes, et c'est précisément cette identité qui est difficile à réaliser. En effet, en dehors d'un certain nombre de conditions que j'ai définies, il y en a d'autres beaucoup plus délicates que j'ai laissé prévoir, les diastases qui agissent sous des poids infiniment petits paraissant pouvoir subir l'influence de matériaux présents en proportion infinitésimale dans la liqueur.

Parmi ces influences, celle de l'acidité et de l'alcalinité, et celle de la lumière et de l'oxygène m'ont paru être à la fois des plus délicates et des plus commodes à étudier. La première a

1. *Medelelser fra Carlsberg Laboratoriet,* 1879.
2. *Annales de l'Institut Pasteur,* 1889, p. 304.

déjà été signalée par M. Kjeldáhl; la seconde a été mise en évidence par M. Duclaux, et plus récemment par MM. Roux et Yersin.

Mode de préparation de la sucrase.

Je me suis adressé pour cette étude à la sucrase, qu'il est facile de se procurer rapidement et en quantité notable; de plus, son action sur le saccharose est relativement simple, et le sucre interverti peut être dosé avec précision au moyen de la liqueur de Fehling. Pour se procurer la sucrase il suffit, comme l'a indiqué M. Duclaux dans sa *Microbiologie*, de remplacer le liquide de culture de l'*Aspergillus Niger* arrivé au terme de son développement par de l'eau sucrée ou même de l'eau pure; au bout de 48 heures environ, on a un liquide actif, qui présente cet avantage de ne renfermer, en dehors de la sucrase, qu'une quantité très faible de matériaux en solution, environ un décigramme par litre. Cette sécrétion de sucrase est accompagnée de phénomènes intéressants sur lesquels je reviendrai plus loin.

Ce liquide qui s'altère rapidement par suite de l'invasion des infiniment petits, si on l'abandonne à lui-même, peut être conservé pendant plusieurs jours si on prend la précaution de l'additionner d'une trace d'essence de moutarde, procédé qui a déjà été employé par M. Roux pour la conservation des diastases; cette essence n'a aucune influence sur l'action de la sucrase.

Un autre procédé, qui permet d'avoir un liquide tout à fait exempt d'organismes étrangers, consiste à cultiver l'Aspergillus en liquide Raulin stérilisé, dans des fioles à tubulure latérale effilée, à fond très plat et à col droit; lorsque la plante est en pleine fructification, on décante le liquide par l'effilure et on le remplace par de l'eau distillée stérile, après avoir lavé la face inférieure de la mucédinée avec de l'eau également stérile. Le maximum d'activité du liquide correspond à peu près au moment où, d'abord jaune verdâtre, il commence à virer du vert au brun clair.

Le procédé de filtration à travers la porcelaine, si précieux pour la stérilisation des liquides, ne conduit dans le cas présent à aucun résultat : plusieurs essais de filtration, faits dans des conditions variées, m'ont montré qu'avec le liquide provenant

de l'Aspergillus, la matière active est presque intégralement retenue par le filtre.

Influence de variations faibles de la réaction du liquide diastasifère sur l'intervention du sucre.

Nous voilà en possession d'un liquide avec lequel nous pouvons essayer des interversions de saccharose. J'ai toujours opéré dans des tubes larges, placés pendant une heure dans un bain-marie réglé à 56°, température d'optimum d'action de la sucrase. J'ai choisi la température de 56°, parce qu'au voisinage du maximum de faibles variations, impossibles d'ailleurs à éviter, dans la température, ne se traduisent que par des variations insignifiantes dans l'action de la sucrase ; j'ai choisi, pour la durée de l'interversion, une heure, parce que, si on la prolonge davantage, les phénomènes d'oxydation, dont je parlerai plus loin, peuvent intervenir et troubler les résultats.

Le volume de liquide renfermé dans mes tubes était toujours de 10^{cc} que j'amenais après l'expérience à 20^{cc} avec les eaux de lavage. Le liquide sucré sur lequel je faisais agir la sucrase était une solution de saccharose à 40 ou 50 0/0, ne réduisant pas la liqueur de Fehling. Au sortir du bain-marie, les tubes étaient refroidis rapidement et additionnés d'un léger excès de potasse, de manière à arrêter toute action. J'ajouterai enfin que lorsque j'ai dû prolonger mes expériences pendant plus de 3 ou 4 heures, j'ai toujours opéré avec des liquides stériles, placés dans des conditions qui ne permettaient pas l'intervention des microbes.

Un premier fait facile à constater, c'est que le liquide à sucrase obtenu comme je viens de le dire apporte toujours avec lui une certaine acidité due à l'acide oxalique produit par l'*Aspergillus;* cette acidité est souvent très faible, mais le liquide supporte toujours l'addition de quantités mesurables de soude étendue avant d'arriver à bleuir le papier de tournesol rouge. J'ai toujours fait usage d'un papier que j'avais reconnu préalablement pouvoir déceler nettement $\frac{1}{50000}$ de soude.

Les expériences qui suivent montrent que la quantité de sucre interverti par une même dose de liquide à sucrase, à peine acide, va en diminuant à mesure que la quantité de soude

présente va en augmentant, bien que cette augmentation de la soude se fasse par degrés si faibles qu'ils n'amènent aucun changement de teinte dans les papiers les plus sensibles; elles font voir que dans les limites où existe ce que nous appelons la neutralité au point de vue des papiers colorés, la sucrase est très sensible à des variations qu'aucun réactif ne pourrait accuser.

Expérience I. — Huit tubes, renfermant chacun 2cc de liquide à sucrase, sont additionnés de quantités croissantes de soude à $\frac{1}{15000}$ et le volume total est amené à 10cc avec de l'eau et de l'eau sucrée. Voici les quantités de sucre interverti au bout d'une heure à 56° :

Nos d'ordre des expériences.	Soude ajoutée en cc.	Proportion correspondante de soude en millionièmes.	Sucre interverti en centigrammes
1	0	0	35,1
2	0,5	3,3	31,8
3	1	6,6	25,4
4	1,5	9,9	17,6
5	2	13	12,1
6	2,5	16	7,1
7	3	19	5,3
8	3,4	23	3,9

Jusqu'à l'essai 4, le liquide est sensiblement acide; à partir de l'essai 7 la réaction est faiblement alcaline.

Expérience II. — Les conditions sont les mêmes que dans l'expérience précédente.

1	0	0	35,1
2	1	10	16,7
3	2	20	6,8
4	2,5	25	3,9
5	3	30	3,0
6	3,5	35	2,2

Ici, j'ai employé de la soude à $\frac{1}{10000}$; dans les essais 1 et 2, la réaction du liquide était sensiblement acide; à partir de l'essai 4, elle était alcaline.

Expérience III. — Je prépare deux liquides A et B, renfermant 40cc du même liquide à sucrase ; A renferme 4cc de soude à $\frac{1}{1000}$; B, 2cc. Chacun de ces mélanges a été amené à 50cc avec de l'eau distillée. B est neutre au papier (c'est ainsi que nous entendrons à l'avenir la mention *neutre*); A est légèrement alcalin; ils ont été additionnés respectivement de 20 et 40 millioniêmes de soude.

5cc, additionnés de 5cc de saccharose à 50 % ont donné au bout d'une heure à 56° :

A	40,7 centigr. de sucre interverti.
B	66,6 — —

Ce ralentissement considérable de l'interversion, lorsque le milieu est alcalin, est-il dû à la réaction du milieu, ou à une altération de la sucrase, facilitée par cette réaction? Les expériences que je rapporterai plus loin, quand j'étudierai les phénomènes d'oxydation, semblent montrer que c'est cette deuxième explication qu'il faut accepter.

Nous pouvons tirer des faits qui précèdent une première conclusion : c'est que des quantités de diastase identiques peuvent fort bien, lorsqu'on les place dans des conditions identiques *en apparence*, intervertir des quantités de sucre très différentes, et que, inversement, des chiffres identiques peuvent être fournis par des quantités de diastase très différentes. Nous pouvons, de plus, y trouver l'explication de certains faits que je ne veux que signaler en passant.

Si l'on prépare un liquide à sucrase avec une culture d'*Aspergillus* faite sans précautions dans une cuvette de porcelaine, et qu'on abandonne à lui-même le liquide obtenu, son activité va d'abord en croissant. Il se peuple, comme je l'ai dit plus haut, de microbes qui vivent de préférence à la surface, et augmentent l'acidité du liquide; cette augmentation d'acidité, si faible qu'elle soit, suffit cependant pour que la richesse du liquide en sucrase semble avoir augmenté; les faits signalés tout à l'heure nous en donnent l'explication. C'est sans doute la même cause qui explique une observation de Ad. Mayer[1], relative à l'augmentation du pouvoir inversif d'une solution de sucrase de la levure, maintenue pendant quelques heures à 32°.

On sait aussi que la sucrase agit, comme les autres diastases, proportionnellement à sa quantité et à la durée de l'action, au moins dans des limites sur lesquelles M. Duclaux a insisté dans sa *Microbiologie*. Je mettrai tout à l'heure en lumière une cause de non proportionnalité au temps; pour ce qui est de la proportionnalité à la quantité, elle n'existe et on ne peut

1. Ad. Mayer, *Die Lehre von den chemischen Fermenten oder Enzymologie*, Heidelberg, 1882, p. 8.

l'observer qu'avec des liquides à sucrase qui se trouvent par hasard neutres ou très voisins de la neutralité ; pour peu que le liquide s'écarte de la neutralité, on conçoit qu'en en prenant des quantités croissantes, on introduit dans les expériences d'interversion des quantités croissantes d'acide ou d'alcali qui empêchent la proportionnalité d'être exacte. Je dois dire cependant, sans qu'il soit pour cela nécessaire d'entrer dans des détails expérimentaux qui m'entraîneraient trop loin, que l'excès d'alcali semble avoir à ce point de vue une influence beaucoup plus considérable que l'excès d'acide ; on retrouve beaucoup plus facilement des nombres proportionnels en opérant avec un liquide faiblement acide qu'avec un liquide alcalin, sans doute parce que dans le second cas les phénomènes d'oxydation, que je vais exposer maintenant, ont une action de plus en plus efficace à mesure que l'alcalinité croît.

Oxydation de la sucrase; sa destruction par la chaleur.

On admet généralement que les diastases sont des matières éminemment oxydables, et plus oxydables en milieu alcalin qu'en milieu neutre ou acide. C'est là une opinion d'ordre général qui, je me hâte de le dire, est en partie exacte pour la sucrase, et qui résulte de faits épars recueillis par divers expérimentateurs, sans qu'on ait jamais fait d'expériences directes destinées à le démontrer. Nous allons voir apparaître dans les phénomènes d'oxydation de la sucrase les mêmes influences, bien qu'un peu moins accentuées, de variations faibles dans la réaction du liquide diastasifère.

Expérience I. — Voici tout d'abord une expérience qui montre que la sucrase s'oxyde en milieu neutre ou voisin de la neutralité.

Les liquides qui m'ont servi sont les mélanges A et B mentionnés plus haut dans ma troisième expérience. A, je le rappelle, est légèrement alcalin, B est neutre; 5^{cc} de ces liquides intervertissent respectivement, en 1 heure, à 56°, 40^{ctg},7 et 66,6 de sucre. Quatre tubes renfermant chacun 5^{cc} de A quatre autres renfermant 5^{cc} de B, sont mis au bain-marie, à 56°. Toutes les heures, je mets dans un tube de chaque série 5^{cc} d'eau sucrée et je dose le sucre interverti après 1 heure. Je trouve les nombres suivants, le numéro d'ordre de chaque expérience indiquant le temps pendant lequel chaque tube est resté à 56° avant l'addition de saccharose.



	A	B
1	38,6	66,6
2	34,1	62
3	32,7	61,3
4	29,3	60
Diminution totale en 4h.	11,4	6,6

On voit qu'avec le liquide le plus alcalin, l'oxydation commence plus tôt et qu'elle est plus énergique qu'avec le liquide neutre. Ici apparaît la cause de non proportionnalité au temps à laquelle je faisais allusion plus haut.

EXPÉRIENCE II. — L'oxygène est bien la cause de la diminution d'activité de ces liquides. Voici, en effet, une expérience dans laquelle un liquide neutre, dont 1cc donnait, au bout de 1 heure à 56°, 25ctg, 4 de sucre interverti, a été chauffé pendant 6 heures à 56°, d'une part dans un tube ouvert, de l'autre dans un tube scellé, vide d'air. Au bout de ce temps une expérience d'interversion a donné :

	Centigr.
Tube vide d'air.	25,4
Tube ouvert	19,8

Il faut cependant ajouter que l'action plus prolongée d'une température de 56°, même en l'absence d'air, eût amené une diminution dans l'activité du liquide, ce qui n'a pas lieu d'étonner, si l'on songe que la sucrase est détruite vers 70°, température qui n'est pas de beaucoup supérieure à la température d'optimum d'action, 56°. Ainsi, le liquide précédent, chauffé pendant 24 heures à 56°, dans le vide, n'a plus donné au bout de ce temps, dans les mêmes conditions que plus haut, que 18ctg,7 de sucre interverti. Concluons donc qu'a cette température lorsque l'action est prolongée au delà de 5 à 6 heures, à la diminution d'activité du liquide par oxydation vient se superposer celle qui est due à l'action de la chaleur.

Cette action de la chaleur, à l'exclusion de celle de l'oxygène, mérite de nous arrêter un instant, parce qu'elle dépend, elle aussi, de la réaction du milieu.

Mais ici se présente une difficulté. Nous n'avons jusqu'à présent opéré qu'avec des volumes égaux d'un même liquide diastasifère; les nombres obtenus étaient comparables, parce que l'identité des conditioms d'expérience se trouvait réalisée. Il n'en sera plus de même si, composant avec les mêmes doses d'un même liquide diastasifère des mélanges neutres, acides ou alca-

lins, nous les soumettons à une cause de destruction que nous voulons montrer agir inégalement sur ces mélanges. Si l'on se reporte aux premières expériences de ce travail, on verra que des volumes égaux de ces liquides ne peuvent plus donner des chiffres identiques, parce qu'il y aura entre eux des différences de réaction.

Voici comment j'ai tourné cette difficulté. Dans l'étude qu'on trouvera exposée plus loin sur l'influence de doses croissantes des divers acides organiques ou minéraux sur l'interversion du sucre par la sucrase, j'ai observé que, à mesure que les doses d'un même acide vont en croissant, l'effet va en s'accélérant, puis en diminuant, de telle sorte que pour chaque acide il y a une dose dont l'effet est maximum. Pour l'acide acétique en particulier cette dose d'effet maximum est de $\frac{1}{100}$. De plus, de petites variations dans la quantité d'acide employé de part et d'autre du chiffre maximum n'introduisent pas de variation appréciable dans la quantité de sucre interverti.

J'ai donc opéré toutes les interversions dont il va être question en présence de $\frac{1}{100}$ d'acide acétique. Devant cette dose l'alcalinité ou l'acidité faible qu'apporte le liquide diastasifère disparaît, comme on le verra, absolument, et des liquides qui, employés tels quels, conduiraient, comme ceux de mes premières expériences, aux chiffres les plus différents, fournissent des quantités de sucre interverti identiques. Je me suis arrêté à l'emploi de l'acide acétique pour plusieurs raisons. D'abord la dose de $\frac{1}{100}$ est assez considérable pour pouvoir être mesurée avec exactitude; de plus, à la température de 56°, l'acide à ce degré de concentration ne prend qu'une faible part à l'interversion du saccharose; il en intervertit pour sa part 5 centigrammes environ, dans les conditions où j'ai opéré, et c'est là une quantité relativement faible si on la compare à celle que la sucrase intervertit en subissant l'influence de l'acide.

Nous voilà donc en possession d'une méthode qui nous permet de réaliser les conditions d'identité dont je parlais en commençant, identité vérifiée expérimentalement comme on va le voir. Revenons à l'action d'une température de 56° sur la sucrase en l'absence d'oxygène. Tous les chiffres qui suivent représentent en centigrammes la quantité de sucre interverti trouvée, dimi-

nuée de celle que l'acide acétique intervertit seul dans les mêmes conditions.

Expérience III. — Je prends des volumes égaux d'un liquide diastasifère très faiblement acide, et je fais trois mélanges, A, B, C, amenés au même volume, et renfermant : A, $\frac{1}{5000}$ d'acide acétique ; B, le liquide laissé tel quel ; C, $\frac{1}{11000}$ de soude. 1 centimètre cube de chacun de ces liquides, en présence de 1 % d'acide acétique, donne, comme je l'annonçais, un seul et même chiffre 13,6 de sucre interverti. Je chauffe ces liquides dans des tubes vides d'air à 56°, pendant 24 heures. Au bout de ce temps, ils me donnent les résultats suivants :

A	B	C
10,6	6,6	2,9

On voit que le liquide acide a mieux résisté que les deux autres, le liquide neutre un peu mieux que le liquide alcalin.

Pour éviter la superposition possible de l'action de la chaleur à celle de l'oxygène, nous sommes naturellement conduit à étudier l'oxydation à température plus basse. Les expériences qui suivent ont été faites à la température de 35°. Pour faciliter l'oxydation, j'ai placé le liquide diastasifère par portions de 10^{cc} dans des fioles à fond plat, à courant d'air, qui ont été décrites et figurées ailleurs[1]. Le liquide y occupait à peine un millimètre en épaisseur ; il était amené après l'expérience à 20^{cc} avec les eaux de lavage de la fiole, et alors on employait pour les essais d'interversion un volume double du volume employé pour l'essai précédant l'expérience.

Expérience IV. — Des liquides préparés comme ceux de l'expérience précédente qui donnaient le chiffre 18, ont fourni, au bout de 20 heures, les résultats suivants :

A	B	C
18	17,5	16,9

L'oxydation a donc été presque insignifiante. J'ai recommencé l'expérience en la prolongeant pendant 48 heures.

Expérience V. — J'ai préparé cinq mélanges renfermant les doses suivantes d'acide ou d'alcali, en millionièmes :

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. I, p. 386.

A	renferme	420	d'acide acétique.	
B	—	270	—	—
C	neutre			
D	renferme	75	de soude.	
E	—	150	—	

Ces liquides qui, avant l'expérience donnaient tous le chiffre 18, donnent après 48 heures d'aération à 35° :

A	B	C	D	E
18	18	17	14,6	10,6

On voit qu'un liquide acide et même neutre résiste au contact prolongé de l'oxygène, qu'un liquide alcalin s'oxyde au contraire et d'autant plus énergiquement qu'il est plus alcalin, fait que nous avons déjà constaté à 56°, et qui se confirme ici une fois de plus.

Si l'on dépasse tant soit peu les doses d'alcalinité indiquées plus haut, l'oxydation s'exagère immédiatement, même à la température ordinaire. En voici un exemple :

Expérience VI. — Trois liquides préparés comme précédemment renferment :

A	400 millionièmes d'acide acétique.
B	neutre.
C	200 millionièmes de soude.

Tous trois donnent le chiffre 21. Abandonnés pendant 16 heures en couche mince, à la température ordinaire, ils fournissent les chiffres suivants :

A	B	C
21	21	17,4

Deux heures plus tard, C n'est plus représenté que par 15,9.

Ainsi l'oxydation, nulle pour un liquide acide à température relativement basse, peu active en somme pour un liquide neutre ou faiblement alcalin, s'accélère considérablement dès que l'alcalinité atteint $\frac{1}{5000}$ de soude. Nous voyons une fois de plus combien il faut de précision dans l'étude de ces phénomènes d'oxydation, et quelle importance a la réaction du liquide diastasifère.

Action de la lumière sur la sucrase.

Jusqu'ici nous avons fait nos essais à l'obscurité. Nous allons voir le phénomène d'oxydation changer absolument de face si

nous faisons intervenir la lumière, et nous présenter toute une série de faits intéressants.

Tout d'abord, *la lumière n'a aucune action sur la sucrase dans le vide, quelle que soit la réaction du milieu.* J'ai pu laisser des tubes exposés au soleil pendant le mois d'août tout entier, sans avoir vu leur activité diminuer. Une constatation analogue avait été faite par M. Roux pour le poison de la diphtérie, sans que cependant l'expérience eût été prolongée pendant aussi longtemps.

Des tubes semblables à ceux de l'expérience précédente, mais ouverts, renfermant les liquides A, B, C, de l'expérience III, relatée plus haut, qui donnent le chiffre 13,6, nous fournissent, après l'insolation, les résultats suivants :

Durée de l'insolation	A (acide)	B (neutre)	C (alcalin)
2h. 30	5,4	8,8	9,2
4h.	3,7	6,6	7,4

Remarquons que cette expérience, faite avec des tubes étroits, ne permet le contact de l'air que par une surface restreinte. Plaçons des volumes égaux des liquides A et B de l'expérience IV dans des matras Pasteur. Avant l'expérience, ces deux liquides donnent le chiffre 18 ; après 3 heures d'insolation, je trouve :

A (acide)	B (neutre)
10,8	12,7

De même, avec les liquides A et B de l'expérience VI, qui donnaient 21, je trouve après 3 heures d'insolation :

A (acide)	B (neutre)
5,2	13

Je pourrais multiplier les exemples ; mais ceux qui précèdent me paraissent démontrer suffisamment que *l'acidité qui conférait à la sucrase une résistance considérable à l'oxydation à l'obscurité, facilite au contraire l'oxydation à la lumière.* Remarquons, toutefois qu'en milieu alcalin ou neutre, l'oxydation se produit aussi, mais bien moins énergiquement.

Ici, nous rencontrons un fait nouveau, qui mérite aussi de nous arrêter un instant. Dans les phénomènes chimiques ordinaires, où interviennent des quantités notables de réactifs, et qui se produisent dans un espace de temps relativement court, nous voyons, dans une même classe de réactifs agissant tous de la même manière, chacun avoir son activité propre. Il n'en est

plus de même dans le phénomène qui nous occupe ; c'est l'acidité du milieu qui favorise l'action de la lumière sur la sucrase, et non la nature de l'acide employé. Voici une expérience qui le prouve.

J'ai préparé des liquides identiques, l'un neutre, les autres renfermant $\frac{1}{20000}$ de divers acides. Tous ces liquides donnaient avant l'expérience le chiffre 18,4. Après 2 heures 1/2 d'insolation, j'ai trouvé les chiffres suivants :

Liquide neutre		14,4
Liquides renfermant $\frac{1}{20000}$ des acides	sulfurique tartrique oxalique acétique succinique	11,1

Donc l'action est la même, quel que soit l'acide, et ne dépend nullement de l'activité avec laquelle il peut lui-même s'oxyder au soleil.

Au point de vue pratique, une conclusion résulte des faits qui viennent d'être exposés. Lorsqu'on voudra faire une série d'expériences avec un même liquide à sucrase, il suffira, pour le conserver presque indéfiniment, de l'avoir produit dans les conditions de pureté que j'ai décrites, et de l'enfermer dans des tubes stériles qu'on scellera vides d'air.

En somme, les trois agents que je viens d'étudier, chaleur, oxygène, lumière, sont des agents de destruction sur lesquels il faut avoir l'œil toujours fixé dans ces études délicates. Aucun d'eux n'agit bien énergiquement, à moins que son action ne soit longuement prolongée, si on le fait agir à l'exclusion des autres; mais en combinant et en superposant leurs influences, ils peuvent conduire à des erreurs notables.

De tous les faits qui précèdent, nous pouvons, au point de vue de nos connaissances sur les diastases, tirer la conclusion générale suivante. L'action d'une diastase est influencée par des causes infiniment petites, le plus souvent impossibles à mesurer ; elle nous apparaît comme une fonction complexe des conditions dans lesquelles elle se produit, si bien qu'une diastase peut être présente sans amener aucune transformation chimique. Nous ne pouvons malheureusement étudier la diastase qu'en dehors

de la cellule qui la sécrète, mais nous concevons l'importance que sa variabilité d'action peut avoir au point de vue de la vie intra-cellulaire, puisqu'elle peut trouver, pour des changements très faibles dans la réaction du protoplasma, des conditions qui tantôt exagèrent son action, tantôt l'annihilent, qui lui permettent de résister aux agents chimiques et physiques de sa destruction ou qui augmentent au contraire sa fragilité.

II

DE L'INFLUENCE DES ACIDES DANS L'INTERVERSION DU SUCRE PAR LA SUCRASE

Après avoir constaté l'augmentation rapide de l'activité de la sucrase dans un milieu d'une acidité très faible mais croissante, il y avait lieu de se demander ce que devient cette activité lorsque l'acidité va en croissant indéfiniment. C'est là une étude qui a été abordée par M. Kjeldahl[1]; il en a indiqué très sommairement les résultats, comme je l'ai fait moi-même plus haut, pour les besoins de l'exposé; mais ces résultats sont loin d'être aussi simples, tout au moins à interpréter, qu'ils pourraient paraître au premier abord, et méritent de nous arrêter quelque temps.

D'une manière générale, la quantité de sucre interverti par la sucrase, en présence de doses croissantes d'un même acide, va en croissant à mesure que l'acidité croît. Mais le phénomène d'interversion, qui était d'abord uniquement dû à la sucrase, influencée par l'acide, ne tarde pas, à partir d'une certaine dose d'acide variable avec chaque acide, à se compliquer; il devient le résultat de la superposition de l'effet de l'acide seul et de la diastase, influencée par l'acide. La quantité de sucre interverti par l'acide seul va en croissant avec la dose d'acide; celle qui est intervertie par la diastase, influencée par l'acide, croît d'abord, puis va en décroissant, de telle sorte que nous devons trouver pour chaque acide une dose d'effet maximum.

Remarquons de suite que l'influence des différentes doses d'un même acide ne peut être exprimée par aucun chiffre, puis-

1. *Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet*, 1881.

qu'il nous est impossible de savoir la quantité de sucre que la diastase intervertirait en l'absence de l'acide : mais nous pouvons, par la marche générale du phénomène, saisir le maximum de l'effet. Il nous suffit pour cela d'étudier l'effet des différentes doses d'un même acide, *en même temps et avec le même liquide diastasifère.*

Afin de discerner, dans ce phénomène complexe, tel que je viens de le présenter, la part qui revient à chacun des deux effets, il faut nous faire une idée de la quantité de sucre que l'acide agissant seul peut intervertir. L'étude complète de l'interversion du sucre par les acides étendus, à une température inférieure à 100°, quelque intérêt qu'elle puisse présenter, est trop en dehors du cadre de ce travail pour que j'aie songé à l'aborder actuellement; je ne veux en signaler ici que quelques points qui m'ont paru particulièrement importants, parce qu'ils jouent un rôle considérable dans toute l'étude de l'interversion du sucre par la sucrase en présence des acides, et qu'ils m'ont permis de trouver l'explication d'un certain nombre de faits dont le mécanisme me paraissait d'abord impénétrable. Je me bornerai à indiquer les principaux résultats, en les appuyant de quelques faits expérimentaux.

Interversion du sucre par les acides étendus à la température de 56°.

Le phénomène de l'interversion du sucre, à une température relativement basse, par les acides étendus, dépend, comme celui de l'interversion par la sucrase, d'un certain nombre de conditions, moins délicates, il est vrai, dont on a bien une notion générale, mais sur lesquelles on n'a pas, à ma connaissance, fait d'expériences précises. Il dépend, entre autres, de la concentration de l'acide, de la température à laquelle il agit, de la durée de l'action, de la *concentration de la solution sucrée.* C'est cette dernière condition qui, pour nous, est la plus importante à considérer; examinons-la tout d'abord.

J'ai choisi trois acides, d'énergies variées, à des concentrations telles que l'interversion ne fût pas trop rapide, l'acide acétique, l'acide oxalique et l'acide sulfurique. Je les ai fait agir à la température de 56°, pendant 1 heure, sur des solutions

sucrées renfermant des poids croissants de saccharose. Voici les résultats obtenus :

Acide acétique.

Concentration [1] de l'acide.	Quantité de saccharose présent à l'origine en grammes.	Quantité de saccharose interverti au bout d'une heure, en centigrammes.
10	1	4
	2	8,2
	3	12,8
20	1	6,6
	2	13,2
	3	18,8

Acide oxalique.

0,1	2	3,2
	3	4,9
	4	6,7
0,2	1	3,2
	2	7,6
	3	12,8
	4	17,4
0,5	1	8,9
	2	18,5
	3	29,1
	4	44,4
1	1	16,7
	2	35
	3	55,3
	4	77,3

Acide sulfurique.

0,2	1	7,6
	2	16,8
	3	25,7
	4	34,8

On voit que pour les trois premières séries d'essais, c'est-à-dire lorsque l'acide agit lentement, *la quantité de sucre interverti est presque exactement proportionnelle à la quantité de saccharose présent à l'origine, ou à la concentration de la solution sucrée.* Pour les autres essais, la quantité de sucre interverti croît plus rapidement que la quantité de saccharose.

Nous aurons à revenir sur ces faits tout à l'heure. Nous

1. Tous les chiffres représentant ici et plus loin la concentration des acides expriment des millièmes, c'est-à-dire le nombre des grammes renfermés dans un litre.

pouvons, dès à présent, y trouver l'explication d'un autre fait que j'ai observé dans l'étude de l'interversion du sucre par les acides étendus, à température basse. Lorsque l'interversion marche très lentement, la quantité de sucre interverti est sensiblement proportionnelle au temps, au moins pendant les premières heures, mais cette proportionnalité ne tarde pas à cesser, et le phénomène à se ralentir. La quantité de saccharose va, en effet, constamment en diminuant, et par suite, la quantité de saccharose qui peut être interverti dans des intervalles de temps égaux va en diminuant également.

La connaissance des faits que je viens d'exposer nous permet maintenant de passer à l'étude de l'influence des acides sur la sucrase. Elle suffit pour préciser les conditions dans lesquelles nos expériences devront être faites.

Interversion du sucre par la sucrase en présence de doses croissantes de divers acides.

Je me suis placé dans les conditions expérimentales que j'ai décrites précédemment. La quantité de saccharose présente dans chacun de mes tubes était toujours $2^{gr},5$ (5^{cc} d'une solution à 50 0/0). Dans le bain-marie réglé a 56°, à côté de chaque tube renfermant la sucrase et l'acide, j'en plaçais un autre destiné à mesurer la quantité de sucre interverti par l'acide seul ; il renfermait la même dose d'acide que le premier et la même quantité de liquide diastasifère préalablement débarrassé de sa matière active par ébullition. J'ai constaté, en effet, que si l'on fait agir l'acide seul sur le sucre, en présence d'eau distillée, la quantité de sucre interverti n'est pas exactement la même qu'en employant la méthode que je viens d'indiquer ; on trouve toujours un ou deux centigrammes de sucre interverti en plus, comme si les matériaux, en si faible quantité cependant, que le liquide diastasifère renferme, avaient une influence légèrement retardatrice sur l'activité de l'acide. Je me suis toujours attaché à opérer avec un liquide diastasifère aussi neutre qu'on peut l'obtenir par le procédé que j'ai indiqué, et à n'étudier que des doses d'acide telles que l'acidité apportée par le liquide à sucrase fût négligeable.

Les nombres qui suivent expriment en centigrammes la

quantité de saccharose interverti au bout d'une heure, déduction faite de celle que l'acide intervertit dans les conditions définies plus haut. Je ne donne, en général, que les résultats d'une seule série d'expériences, choisie parmi toutes celles que j'ai faites comme me paraissant la plus probante.

Acide sulfurique.

Doses d'acide.	Saccharose interverti en centigrammes.
0,025	29
0,05	29
0,1	29,1
0,2	26,5
0,5	13
1	0

La difficulté de doser exactement, à cause de la faible acidité du liquide diastasifère, une quantité d'acide inférieure à 0,025 m'a obligé à ne pas pousser l'essai plus loin. On voit que le maximum est inférieur à cette dose. L'acide ne commence à intervertir de sucre pour sa part qu'à partir de la dose 0,05.

Acide oxalique.

0,025	41,6	»
0,05	45,7	17,8
0,066	»	19,5
0,1	47	18,1
0,125	»	17,7
0,2	45,5	17,2
0,5	36,2	»
1	21,1	11,1
2	3,7	2
4	0	0

L'acide oxalique présente un maximum net correspondant à la dose 0,066 ou $\frac{1}{15000}$. Cette dose d'acide n'intervertit pas de sucre pour sa part. Nous verrons tout à l'heure l'influence de cette circonstance sur la netteté du maximum.

Acide tartrique.

Doses d'acide.	Sucre interverti en centigrammes.	
0,05	38,5	»
0,1	57	»
0,2	63,2	»
0,25	»	60
0,5	»	66,6
1	64,8	67
2	»	64
4	»	56
5	52,4	»

Acide succinique.

Doses d'acide.	Sucre interverti en centigrammes.
0,05	32,2
0,1	33,7
0,2	36
1	36,7
2	37,2
4	36,6
8	35,2

Acide lactique.	
0,1	36
0,2	36,1
0,5	36,8
1	36,8
2	36,8
5	37,8
10.	33,7
20.	32

Acide acétique.	
0,1	61,7
2,0	65,8
1.	72
2.	73,5
5.	73,3
10.	73,2
20.	73,3
50.	50

On voit qu'avec l'acide oxalique la marche du phénomène apparaît nettement, surtout dans la première série de chiffres que je donne, la seconde n'ayant pour but que de préciser plus exactement la situation du maximum. L'acide, qui active d'abord l'action de la sucrase jusqu'au maximum, la retarde ensuite jusqu'au moment où cette action devient nulle et où l'acide agit seul.

Il n'en est pas de même pour les autres acides, pour lesquels le maximum, ou du moins le maximum apparent, correspond à une dose capable d'intervertir pour sa part une quantité de sucre très appréciable. Voici, en effet, les quantités de sucre interverti, dans les conditions où je me suis placé, par ces doses maximum apparent :

	Doses d'acide.	Sucre interverti en centigrammes.
Acide tartrique	1	8,5
» succinique	2	4,3
» lactique.......	5	12,2
» acétique	10	6,3

Avec ce dernier acide, la dose d'effet maximum est encore moins nette qu'avec les autres, et si je lui assigne le chiffre de 10 ou $\frac{1}{100}$, c'est parce qu'il est assez sensiblement la moyenne entre les chiffres 1 et 20 qui, comme l'expérience nous le montre, comprennent entre eux le maximum.

Pour trouver l'explication de la différence que présentent les derniers acides avec l'acide oxalique, il nous suffit de nous reporter à l'étude, par laquelle nous avons commencé, de l'interversion par les acides seuls. Comme je l'ai dit plus haut, j'ai toujours fait, pour chaque dose d'acide, deux expériences simultanées dont l'une était destinée à mesurer la quantité de sucre interverti par l'acide seul. Or il est certain que le chiffre trouvé ne donne qu'une idée approchée et exagérée de ce que l'acide peut faire dans le tube voisin. Dans ce tube, en effet, il y a de

la sucrase, dont l'effet exagéré par la présence de l'acide, tend à diminuer de plus en plus la quantité de saccharose présent. Par conséquent, l'interversion par l'acide seul doit devenir de moins en moins active.

Cette différence, que le raisonnement appuyé sur les faits nous montre devoir exister entre nos deux tubes, ne peut, il est vrai, être considérable; elle ne dépasse certainement pas 3 ou 4 centigrammes; mais elle suffit pour effacer le maximun sans que nous ayons le moyen de le faire apparaître plus nettement. Si, en effet, l'emploi d'un liquide très actif exagère cette différence, l'emploi d'un liquide moins riche en sucrase nous donne des nombres qui, au voisinage du maximum, diffèrent trop peu les uns des autres pour qu'on ne doive pas les considérer comme identiques.

Nous ne pouvons donc, avec ces acides, que connaître les limites qui comprennent le maximum, sans savoir exactement à quelle dose ce maximum correspond, et nous devons simplement le considérer, dans une approximation suffisante, et lorsqu'une indication plus nette nous fait défaut, comme situé à égale distance de ces deux limites extrêmes. C'est ainsi que nous avons assigné, pour l'acide acétique, à la dose de maximum d'effet le chiffre $\frac{1}{100}$.

Nous voyons de plus un fait que j'ai énoncé précédemment et qui nous montre que l'approximation dont je viens de parler est suffisante: au voisinage du maximum, des variations notables dans la dose d'acide ne se traduisent que par des variations insignifiantes dans la quantité de sucre interverti.

Activité spécifique des divers acides.

Si nous considérons les acides dans l'ordre dans lequel je les ai étudiés, nous voyons que le maximum d'effet correspond à des doses de plus en plus considérables. Nous pourrons donc dire que l'activité qu'un acide communique à la sucrase ou son activité spécifique est d'autant plus grande que le maximum d'effet est produit par une dose plus faible. On voit qu'en classant les acides d'après cette définition, comme je l'ai fait plus haut, ils ne se trouvent pas placés dans le même ordre que si on les rangeait d'après l'activité avec laquelle ils intervertissent le sucre.

Indépendamment de cette situation du maximum, variable avec les différents acides, il y avait lieu de se demander si l'effet produit par la dose maximum de chacun des acides sur une même quantité de sucrase serait différent, et si, à l'activité spécifique telle que je viens de la définir, ne s'en ajouterait pas une autre se manifestant par une action plus ou moins énergique suivant la nature de l'acide. Il fallait rechercher si, en faisant agir sur une même dose de sucrase, en présence de la même quantité de sucre, les doses des différents acides qui correspondent au maximum d'effet, on trouverait des chiffres différents ou identiques.

Voici les résultats de l'expérience :

	Doses d'acide.	Sucre interverti par l'acide et la diastase.	Sucre interverti par l'acide seul.	Différence des 2 chiffres précédents.
Acide sulfurique. . . .	0,05	31,3	0,7	30,5
» oxalique	0,066	30	0	30
» tartrique	1	40	8,6	31,4
» succinique . . .	2	34,2	3,7	30,5
» lactique.	5	41,5	12,2	29,3
» acétique	10	37,9	7,2	30,7

On voit que les chiffres de la dernière colonne sont assez peu différents pour qu'on puisse les considérer comme identiques, et n'envisager leurs différences que comme étant dues à des erreurs de dosage. Nous devons donc conclure que les différents acides ne manifestent pas d'autre activité spécifique que celle que nous avons définie plus haut.

Comment une même dose d'acide acétique se comporte-t-elle en présence de doses variables de sucrase?

Si je me suis étendu aussi longuement sur cette étude de l'influence des acides sur la sucrase, c'est que, en dehors de l'intérêt qu'elle peut avoir en elle-même, il pourrait en sortir un résultat pratique au point de vue du dosage de la sucrase.

Revenons à l'interversion en présence de $\frac{1}{100}$ d'acide acétique. Comme je l'ai montré au chapitre I, les différences de neutralité des liquides diastasifères disparaissent absolument devant cette dose. Aux raisons qui m'ont déterminé à faire choix de l'acide acétique vient s'ajouter la suivante, qui est bien plus importante:

3

en additionnant le liquide à sucrase d'acide acétique, on est sûr, à cause du peu d'énergie de cet acide, de n'en déplacer aucun autre qui pourrait se trouver dans le liquide à l'état de sel, et d'opérer en présence d'un acide unique.

L'emploi de l'acide acétique étant justifié par ces raisons, demandons-nous s'il ne pourrait pas nous servir à doser la sucrase avec précision. Quelles conditions cet acide, qui fait disparaître les causes d'erreurs étudiées jusqu'ici, doit-il encore réaliser pour nous conduire à un semblable résultat? Il faudrait évidemment que son influence sur des quantités variables de sucrase fût proportionnelle à ces quantités. En d'autres termes, en intervertissant du sucre en présence de $\frac{1}{100}$ d'acide acétique, toutes choses égales d'ailleurs, avec des quantités de liquide diastasifère représentées par les nombres 1, 2, 3, 4, et retranchant des quantités totales de sucre interverti, celles qu'intervertit l'acide seul, trouve-t-on des nombres proportionnels à 1, 2, 3, 4? L'expérience d'abord, le raisonnement ensuite, nous répondent qu'il n'en est pas ainsi. Voyons d'abord l'expérience.

J'ai pris 1, 2, 3, 4^{cc} d'un liquide diastasifère aussi exactement neutre que possible, et j'ai trouvé les résultats suivants :

Quantité de sucrase employée.	Sucre interverti par le liquide neutre.	Sucre interverti en présence d'acide acétique.
1	14,3	22
2	28,4	39,2
3	40,7	54
4	52,6	67

Le liquide neutre ne donne de chiffres proportionnels aux quantités que pour les deux premiers essais; pour les deux autres les chiffres sont inférieurs à ce qu'ils devraient être dans le cas de la proportionnalité. Cela tient à deux causes : la première, que j'ai exposée au commencement de ce travail, résulte de ce que le liquide n'est pas absolument neutre, mais probablement légèrement alcalin; la seconde résulte de l'influence de la quantité de sucre interverti, qui est supérieure, à partir de l'essai 3, au $\frac{1}{10}$ de la quantité totale de saccharose présent (2 gr. dans chaque tube), influence qui a été mise en lumière par M. Duclaux. Mais même pour les essais 1 et 2, pour lesquels la proportionnalité existe, les quantités de sucre interverti en présence de l'acide ne sont pas entre elles comme les nombres 1 et 2. Il semble que

l'acide agisse plus énergiquement sur les quantités de diastase les plus faibles que sur les quantités plus fortes.

Voici une autre expérience dans laquelle, l'interversion étant moins active et le liquide diastasifère plus neutre, la proportionnalité presque absolue existe pour le liquide neutre, mais qui présente les mêmes faits pour le liquide agissant en présence d'acide acétique :

Quantité de de sucrase.	Sucre interverti par le liquide neutre.	Sucre interverti en présence d'acide acétique.	Chiffres proportionnels calculés.
2	3,8	5,4	5,4
3	5,7	7,4	8,1
4	7,7	9,5	10,8
5	9,6	11,5	13,5

Ces chiffres étant moins élevés présentent avec les nombres qui répondraient à la proportionnalité, et que j'ai inscrits dans la dernière colonne, une différence moins grande que ceux de la première expérience.

Si nous nous reportons à ce que nous avons appris sur l'interversion par l'acide seul, nous trouvons de ce fait de l'exagération apparente de l'influence de l'acide sur la quantité de diastase la plus faible une explication simple, et nous voyons que les choses ne peuvent pas se passer autrement. En effet, si nous considérons deux tubes renfermant des quantités de diastase représentées par 1 et 2, le saccharose disparaît plus vite dans le second tube que dans le premier, parce qu'il y a plus de diastase, et par suite l'acide intervertit moins de sucre dans ce tube, de sorte que dans le résultat final de l'expérience la part que nous faisons à l'effet de l'acide dans le second tube est exagérée, et la part qui doit être faite à la diastase est diminuée d'autant.

Nous ne pouvons donc pas appliquer immédiatement l'emploi de l'acide acétique au dosage de la sucrase. La variation de la quantité de sucrase, qui est précisément le fait intéressant à constater dans la sécrétion de cette diastase par un être inférieur, introduit dans le phénomène de l'interversion en présence d'acide acétique une complexité qui nous oblige à chercher une méthode détournée permettant d'arriver à un dosage exact. Je dois cependant faire remarquer que l'interversion en présence de l'acide acétique peut nous permettre d'étudier la marche de

la sécrétion de la sucrase, et, si elle ne nous donne pas de renseignements très précis sur sa quantité absolue, elle peut cependant nous indiquer si cette quantité va en croissant ou en décroissant.

III

DOSAGE DE LA SUCRASE DE L'ASPERGILLUS NIGER.

J'ai essayé de donner dans ce qui précède une idée des difficultés que présente le dosage de la sucrase; j'ai montré d'une part les graves causes d'erreur auxquelles on s'expose en cherchant à doser cette diastase en milieu neutre; j'ai fait voir, d'autre part, que son action en milieu acide, tout en faisant disparaître ces causes d'erreur, ne permet cependant pas d'arriver à un procédé de mesure immédiat, parce que les quantités de sucre interverti dans ces conditions ne sont pas proportionnelles aux quantités de sucrase employées.

On peut néanmoins songer à utiliser les notions qui résultent des faits que j'ai exposés et fonder sur elles une méthode de mesure un peu détournée, il est vrai, mais qui n'en conduit pas moins à un dosage précis. On ne saurait d'ailleurs s'attendre à un procédé de dosage simple pour une substance dont l'action est soumise à tant de causes de perturbation, si l'on songe que cette action même peut seule servir de moyen de mesure.

L'exposé de cette méthode exige le développement d'une notion nouvelle, la définition de ce que nous appellerons désormais l'*unité de sucrase*. Remarquons, en effet, que nous n'avons jusqu'ici introduit dans notre exposé aucune idée d'unité, pas plus que ceux qui se sont avant nous occupés des diastases. Il nous semble qu'il y a là une lacune qu'il sera facile de combler au fur et à mesure que les connaissances qu'on a sur chaque diastase en particulier se seront complétées, et que nous saurons mieux toutes les influences qui modifient leur action. Pour la sucrase, en particulier, nous pouvons dès maintenant définir ce que nous appellerons l'unité, et nous en tirerons immédiatement un avantage considérable, celui de fixer les idées en abrégeant le langage, et de faciliter la comparaison des différentes quantités en présence desquelles nous pourrons nous trouver.

Qu'avons-nous appris au sujet de la sucrase? Nous savons que la quantité de sucre interverti par une *dose déterminée de sucrase* dépend de la température, de la durée de l'action, de l'acidité du milieu, sous la réserve des faits que nous avons rappelés plus haut. Nous devons donc, dans notre définition, tenir compte de toutes ces influences, et nous pouvons dès lors définir l'unité de sucrase comme il suit : *L'unité de sucrase est une quantité de sucrase capable d'intervertir* 20 *centigrammes de saccharose en une heure à la température de* 56°, *en présence de* $\frac{1}{100}$ *d'acide acétique*. Les 20 centigrammes ne comprennent pas le sucre interverti par l'acide seul; ils sont la différence entre le sucre interverti total et ce que l'acide intervertit pour sa part, cette dernière quantité pouvant subir, d'une expérience à l'autre, des variations sur lesquelles j'ai déjà appelé l'attention. Remarquons de plus qu'il ne faudrait pas attribuer à cette définition un caractère trop général, parce qu'elle ne vise que des faits établis en se servant de la sucrase de l'Aspergillus.

Les faits que j'ai exposés précédemment expliquent suffisamment le choix de la durée de l'action et de la température dans notre définition pour qu'il soit inutile d'insister davantage. On pourra employer tout autre acide que l'acide acétique, à la dose de maximum d'effet, toutes les fois qu'on sera sûr que cet acide est le seul présent dans la liqueur. Quant au chiffre de 20 centigrammes, il est clair qu'il est choisi arbitrairement; mais son choix a été dicté par ce fait qu'opérant toujours l'interversion avec 10^{cc} de liquide et amenant avec les eaux de lavage du tube à 20^{cc}, j'ai toujours eu ainsi un liquide renfermant environ 1 0/0 de sucre à l'état de sucre interverti, c'est-à-dire que j'étais toujours placé dans les conditions dans lesquelles on se place pour titrer la liqueur de Fehling, qui sont les seules dans lesquelles les dosages de sucre soient absolument comparables.

On remarquera que cette définition ne tient évidemment pas compte d'autres influences, spéciales à chaque essai, que subit l'action de la sucrase, en particulier des sels ou des matériaux en solution présents dans la liqueur en dehors de la sucrase elle-même; nous verrons plus loin comment on peut, dans la pratique, tenir compte de ces influences qui ne sont nullement négligeables lorsqu'on veut arriver à un chiffre précis. Pour le moment, la définition telle que nous l'avons donnée nous permet

d'exposer la marche générale du dosage; elle en renferme implicitement le principe.

Un liquide à sucrase étant donné, au lieu de chercher la quantité de sucre que peut intervertir un volume déterminé de ce liquide, en présence d'acide acétique, nous chercherons quel est le volume qu'il faut en employer pour intervertir une quantité de sucre fixée à l'avance une fois pour toutes, 20 centigrammes par exemple, et, de la quantité de liquide employé, nous déduirons par un simple calcul quelle est sa richesse en sucrase. Le premier mode de dosage nous eût conduit à fonder notre calcul sur une proportionnalité qui, l'expérience nous l'a montré, n'existe pas; dans le procédé de dosage que nous proposons, la proportionnalité sur laquelle le calcul repose est évidemment toujours réalisée.

Quelques détails sont nécessaires pour compléter l'exposé théorique de ce mode de dosage. Il exige tout d'abord que l'on ait en sa possession un liquide à sucrase, obtenu comme celui dont je me suis servi jusqu'ici dans mes expériences, et dont 1^{cc} renferme l'unité de sucrase telle qu'elle a été définie plus haut. C'est ce que j'appellerai dorénavant la *sucrase normale*. Nous allons voir tout à l'heure l'utilité de cette liqueur.

On commence par déterminer l'acidité du liquide dans lequel on veut doser la sucrase. On fait ensuite un certain nombre d'expériences préliminaires simultanées, destinées à indiquer quel est le volume de liquide qui renferme l'unité de sucrase. Dans une série de tubes on introduit des volumes croissants de ce liquide, 1, 2, 3, 4, 5 centimètres cubes, et s'il y a lieu, la quantité de soude nécessaire pour neutraliser aussi exactement que possible les volumes de liquide employé. Puis on ajoute 1^{cc} d'acide acétique à 10 0/0, et dans tous les tubes le même volume de saccharose à 50 0/0, de manière à ne pas dépasser le volume total de 10^{cc}, et à le compléter même, le cas échéant, avec de l'eau distillée. En pratique, lorsque 4^{cc} du liquide ne renferment pas l'unité, il est assez peu riche en sucrase pour qu'un dosage approximatif, comme celui que nous exposerons plus loin, soit suffisant. En effet, si tel est le cas, 100^{cc} du liquide ne renferment pas assez de sucrase pour intervertir 5 grammes de saccharose dans les conditions où on opère, c'est-à-dire dans des conditions de température et même, en général, d'acidité bien plus favorables à l'in-

terversion que celles que réalise la culture de l'organisme étudié. On peut donc s'arranger de manière à amener les volumes de liquide, de soude et d'acide employés à ne pas dépasser 6cc: on peut alors employer 4cc de saccharose ou 2 grammes, et dès lors on est placé dans les conditions où les expériences d'interversion sont comparables, c'est-à-dire où il n'y a pas plus de 1/8 du sucre total présent interverti à la fin de l'expérience. Après avoir laissé la série de tubes pendant 1 heure au bain-marie réglé à 56°, on arrête l'interversion en ajoutant dans chaque tube un léger excès de potasse ou de soude, et on fait le dosage du sucre interverti dans le tube renfermant 1cc et dans celui qui en renferme 4, après avoir amené le contenu de chacun de ces tubes à 20cc.

Si la différence entre les chiffres trouvés pour les deux tubes ne s'élève pas à un centigramme, la quantité de sucrase renfermée dans le liquide peut être considérée comme nulle ou négligeable. Mais la certitude à ce point de vue n'est acquise qu'à la suite d'une deuxième expérience dont la marche est un peu différente, et dont le résultat plus rigoureux doit venir confirmer ce premier essai préliminaire. Remarquons, en effet, que si le liquide étudié ne renferme pas de sucrase, et si, par suite, le sucre interverti dosé résulte uniquement de l'action de l'acide, il y a néanmoins entre nos deux tubes une différence qui provient de ce que l'un renferme 1cc de liquide et l'autre 4, et que les matériaux que ce liquide apporte peuvent avoir une influence sur l'interversion par l'acide, influence qui ne sera pas la même dans les deux tubes. L'essai suivant permet de conclure plus rigoureusement à l'absence de sucrase. Dans deux tubes on introduit 4cc de liquide; on neutralise, s'il y a lieu, par la quantité de soude nécessaire, déterminée dans le dosage de l'acidité; on porte l'un des tubes à l'ébullition; on laisse refroidir et on complète le volume de 10cc de chacun de ces tubes par l'addition de l'acide acétique, du saccharose et d'eau distillée. S'il n'y a pas de sucrase, la même quantité de sucre, à 2 ou 3 centigrammes près, s'intervertit en 1 heure, à 56°, dans les deux tubes. L'expérience m'a montré que c'est là une méthode des plus sensibles pour reconnaître la présence de traces de sucrase; dès que la différence entre les deux tubes dépasse 5 centigrammes, on peut affirmer la présence de la diastase. Il est clair que dans ces circonstances l'essai ne peut être que qua-

litatif; mais la conclusion qu'il entraîne n'en a pas moins sa valeur. D'ailleurs, si quelque doute subsistait relativement à cette conclusion, il suffirait de prolonger de 2 ou 3 heures l'expérience d'interversion pour voir la différence s'accentuer notablement. Nous avons donc là un moyen dé déceler des traces de sucrase.

Voyons maintenant comment le dosage doit être conduit dans le cas où l'on est en présence de quantités de sucrase notables. Les tubes qui ont servi aux essais préliminaires dont j'ai parlé plus haut nous donnent des quantités de sucre interverti variables, parmi lesquelles on choisit celle qui se rapproche le plus d'un nombre compris entre 25 et 30 centigrammes. On reprend alors l'essai avec le volume de liquide employé dans ce tube et des volumes voisins ; par exemple, si le tube en question renfermait 2^{cc} de liquide, on recommence trois essais, l'un avec 1^{cc},9, le second avec 2^{cc}, le troisième avec 2^{cc},1. On a soin, pour chaque essai, d'employer deux tubes, dont l'un renferme le liquide chauffé, c'est-à-dire dans lequel on a détruit la sucrase par ébullition. En général on aura ainsi un essai dans lequel la différence entre les deux tubes se rapprochera beaucoup de 20 centigrammes ; elle sera comprise entre 19 et 21 centigrammes et cette approximation suffit pour qu'on puisse conclure par le calcul au volume qui renfermerait l'unité. Il résulte en effet d'expériences que j'ai faites que si les nombres fournis par des quantités de sucrase très différentes ne sont pas proportionnels à ces quantités, il n'en est plus de même si les quantités employées sont très voisines. Dans ce cas, la proportionnalité aux quantités existe très sensiblement, comme le prouvent les expériences suivantes.

Quantité de sucrase employée.	Sucre interverti en centigrammes.
3,8	20,3
4,0	21,0
4,2	22,0

Ici, si nous nous rapportons au chiffre moyen 4, nous voyons que la quantité de sucrase ne varie que de 1/20 de sa valeur. Si la variation devient plus grande, les chiffres cessent d'être proportionnels aux quantités de diastase. En voici un exemple :

Quantité de sucrase employée.	Sucre interverti en centigrammes.
1,1	15,5
1,2	15,7
1,3	16,4
1,4	16,8

Je ferai remarquer, en passant, que ces derniers chiffres confirment une fois de plus le fait signalé plus haut, de l'exagération de l'influence de l'acide sur les doses faibles de sucrase. Il est, en effet, facile de voir que si, prenant pour terme de comparaison une quelconque des quatre quantités de sucrase employée, on calcule d'après le chiffre fourni par cette quantité les chiffres qui devraient être fournis par les trois autres, on trouve que tous ceux qui précèdent dans la série sont inférieurs, tous ceux qui suivent supérieurs aux chiffres trouvés par l'expérience.

Nous voyons, en somme, qu'il est inutile de s'astreindre à prendre exactement le volume de liquide qui renferme l'unité de sucrase. Il suffit d'employer un volume très voisin, pourvu qu'il n'en diffère pas de plus de 1/20 de sa valeur. L'emploi de la méthode que je viens de décrire nous présente en outre un avantage. Le liquide à étudier renferme souvent du sucre interverti; si le dosage de ce sucre peut être intéressant à d'autres points de vue, il n'y a pas lieu de nous préoccuper de sa présence dans le dosage de la sucrase. En effet, la faible quantité de sucre interverti introduite avec le liquide à sucrase est introduite dans nos deux tubes, et comme nous faisons la différence des chiffres fournis par ces deux tubes, elle disparaît dans nos calculs. Le seul fait important à noter, c'est celui qui peut résulter de la présence du saccharose dans le liquide à sucrase. Cette circonstance peut introduire, dès l'origine, une faible différence entre nos deux tubes, en exagérant légèrement la quantité de sucre interverti dans le tube à liquide chauffé. Si, en effet, le liquide n'a pas été amené très rapidement au delà de la température de destruction de la sucrase, une petite quantité de saccharose pourra s'intervertir pendant le temps que le liquide met à atteindre cette température. Cette cause d'erreur est très faible dans le cas présent, parce qu'on n'emploie qu'un faible volume d'un liquide généralement peu riche en saccharose. Il est néanmoins utile de se mettre en garde contre elle, et de songer qu'en d'autres circonstances elle pourra prendre une importance beau-

coup plus grande. Le pouvoir réducteur d'un liquide riche en sucrase, renfermant du sucre interverti et du saccharose, pourra s'accroître après qu'on l'aura fait bouillir, et cet accroissement du pouvoir réducteur pourra varier notablement suivant que le liquide aura été porté plus ou moins rapidement à la température à laquelle la sucrase est détruite, parce que le temps pendant lequel la sucrase aura pu intervertir du saccharose avant sa destruction aura été plus ou moins long.

Indépendamment de cette cause d'erreur, peu importante en somme, il y en a une autre sur laquelle il est utile d'insister, et qui va nous ramener à la sucrase normale dont j'ai parlé plus haut. J'ai signalé tout à l'heure l'influence que peuvent avoir les matériaux que le liquide apporte avec lui sur l'interversion par l'acide; il ne faut pas davantage perdre de vue l'influence que ces éléments peuvent avoir sur l'interversion par la sucrase, et cette influence nécessite l'introduction dans nos calculs d'un terme de correction qui sera plus ou moins important suivant les circonstances. Lorsqu'on a déterminé le volume qui renferme l'unité, il faut faire un essai en introduisant dans un tube ce volume de liquide préalablement chauffé et 1^{cc} de sucrase normale. Si dans cet essai on trouve 20 centigrammes, on a la preuve que les matériaux présents en dehors de la sucrase n'ont pas d'influence; si on trouve un chiffre différent, c'est ce chiffre qui dans le cas présent représente l'unité de sucrase. Supposons, par exemple, qu'on ait trouvé le chiffre 18; l'expérience nous prouvera que les matériaux présents dans le liquide ont une influence légèrement retardatrice, puisque une quantité de sucrase qui, en leur absence, donnait le chiffre 20, c'est-à-dire l'unité, ne donne plus que 18 lorsqu'ils sont présents. Le chiffre 18 doit donc être considéré dans notre dosage comme représentant l'unité, et le volume de liquide qui renferme l'unité et qui donnerait ce chiffre 18 devra être calculé en partant du volume qui donne le chiffre le plus rapproché de 18.

Les explications dans lesquelles j'ai été obligé d'entrer, les nombreux détails qu'il m'a fallu donner, contribuent à augmenter, je ne me le dissimule pas, la complexité apparente de notre procédé de dosage; mais la pratique de la méthode est en somme beaucoup plus simple qu'elle ne paraît à la lecture, et les nombreux résultats dignes d'intérêt qu'elle peut fournir ne sont pas

à mettre en balance avec les quelques difficultés de son application.

Il me reste à indiquer ce qu'il y aura à faire dans le cas où cc du liquide ne renfermeraient pas l'unité. Dans ce cas, il faudra se contenter d'une approximation, en prenant pour base du calcul de proportionnalité le chiffre représentant la différence entre les deux tubes. Cette approximation sera, comme je l'ai dit plus haut, suffisante dans la plupart des cas, et se rapprochera d'autant plus de la réalité que le chiffre trouvé dans l'expérience sera plus voisin de 20. Plus la quantité de sucrase sera faible, plus le chiffre déterminé par le calcul sera exagéré, parce que le chiffre fourni par l'expérience sera plus élevé que celui qui correspond à la quantité de sucrase employée. Il ne faut cependant pas oublier que bien qu'un liquide aussi peu riche en sucrase ne se prête pas à un dosage précis, nous pouvons néanmoins savoir avec certitude si, dans une série de liquides, la quantité de sucrase va en croissant ou en décroissant; et si la connaissance précise de tous les stades d'un phénomène de sécrétion nous échappe, il ne nous en est pas moins permis d'étudier le sens de sa marche, et quand cette marche est croissante, de faire un dosage précis dès que la quantité de sucrase atteint un chiffre qui, nous le verrons, est encore au-dessous de ceux que nous rencontrerons généralement.

Nous voilà donc en possession d'une méthode qui nous permet de déceler des traces de sucrase, et de la doser avec une approximation d'autant plus grande que sa quantité est elle-même plus considérable. Nous sommes maintenant en mesure de rechercher quelle est la marche de la sécrétion de cette diastase par un organisme déterminé.

IV

FORMATION DE SUCRASE CHEZ L'ASPERGILLUS NIGER.

Étude de la sucrase dans le liquide de culture de l'Aspergillus.

L'organisme dont l'étude se présente naturellement à nous, c'est précisément l'Aspergillus Niger, qui nous a servi jusqu'ici comme source de sucrase; c'est par lui que nous commencerons cette étude, nous réservant de l'étendre ensuite à d'autres êtres,

pour démêler, dans les faits que nous allons constater, ce qu'il y a de particulier à l'Aspergillus et ce qu'il y a de général.

Commençons par étudier le liquide de culture de l'Aspergillus; l'examen de ce liquide aux différents stades du développement de la mucédinée soulèvera une série de questions que nous verrons peu à peu s'éclairer à mesure que nous pénétrerons plus avant dans l'intimité du phénomène. Nous pouvons pour cette étude placer l'Aspergillus dans diverses conditions, et voir comment ces conditions influent sur l'apparition de la sucrase dans le liquide de culture.

Mettons à l'étuve, à 35°, un certain nombre de cuvettes renfermant le même volume de liquide Raulin, et ensemençons-les également, c'est-à-dire avec un nombre de spores aussi identique que possible, résultat que nous obtiendrons en introduisant dans chacune de ces cuvettes le même volume d'eau distillée tenant en suspension des spores d'Aspergillus empruntées à une culture récente. Dès que le développement a commencé sur ces cuvettes, nous en sortons une de l'étuve, nous décantons le liquide de culture, nous lavons la plante à l'eau distillée, nous ajoutons les eaux de lavage au liquide de culture, et nous ramenons le volume de ce liquide au volume initial, ou, si l'évaporation a été faible, à un volume supérieur que nous notons. Nous pouvons d'une part étudier ce liquide en déterminant ce qu'est devenue son acidité, sa teneur en sucre, interverti ou non, quelle est sa richesse en sucrase, et d'autre part mettre les données de ces diverses expériences en relation avec le poids de la plante produite, en pesant celle-ci après l'avoir desséchée à 100°. Répétons cette expérience toutes les 24 heures avec une nouvelle culture ; voici les résultats que nous obtiendrons.

EXPÉRIENCE I. — Chaque cuvette renferme dans 400cc de liquide Raulin :

Saccharose . . . . 17gr,6.
Acide tartrique libre . . . . . . 0gr,72, ou 1,8 pour 1000.

Durée.	Sacch. restant. gr.	S. int. gr.	Sucre cons. gr.	Acidité. gr.	Sucrase.	Poids de plante. gr.	Cendres. gr.
2	4,4	8,3	4,9	1,16	0	3,105	0,116
3	0,3	4,5	12,8	0,74	50	6,200	0,171
4	0	0	17,6	0,076	67	7,835	0,197
6	0	0	»	0,038	104	6,870	0,200
8	0	0	»	traces.	285	5,580	0,198

Quelques détails compléteront utilement ce tableau. Le titre des deux dernières colonnes explique suffisamment les nombres qu'elles renferment. Les chiffres de la 1re colonne expriment le nombre de jours au bout desquels l'étude de la culture a été faite. La 2e et la 3e colonnes expriment le sucre restant, dans la 2e à l'état de saccharose, dans la 3e à l'état de sucre interverti, cette dernière quantité étant exprimée en saccharose. La 4e colonne indique la quantité de sucre consommé, la 5e l'acidité totale, évaluée en acide tartrique. Dans la 6e colonne, j'ai indiqué la sucrase en unités, les chiffres gras correspondant à un dosage approximatif.

Quelques indications relatives au dosage de cette sucrase serviront d'exemple au procédé de dosage que j'ai décrit plus haut. J'indique chaque dosage par le chiffre correspondant de la 1re colonne.

2. 1^{cc} et 4^{cc} du liquide ont donné respectivement $9^{cgr},4$ et $9^{cgr},6$ de sucre interverti : d'autre part 4^{cc} de liquide chauffé et 4^{cc} de liquide tel quel ont donné respectivement $9^{cgr},7$ et $9^{cgr},6$. La conclusion est qu'il n'y a pas de sucrase.

3. 5^{cc} ont donné respectivement dans les deux tubes $23^{cgr},3$ et $9^{cgr},8$, dont la différence est $13^{cgr},5$. En admettant la proportionnalité, il faudrait employer $7^{cc},4$ pour avoir l'unité, ce qui fait en nombre arrondi, pour les 400^{cc} de liquide, 50 unités.

4. Ici j'ai suivi une marche un peu différente, mais qui, en somme, revient au même. 50^{cc} de liquide ont été amenés à 60^{cc} avec de l'eau et la soude nécessaire pour les neutraliser. L'emploi de 4^{cc} de ce mélange, ce qui correspond à $3^{cc},3$ du liquide primitif, m'a donné comme différence des deux tubes 12,9. Le calcul montre qu'il faudrait employer $5^{cc},1$ du liquide primitif pour avoir l'unité. En réalité, il en faudra plus, à cause des faits de non proportionnalité que j'ai indiqués. Je fais un essai avec 6^{cc}, et j'obtiens pour les deux tubes 27,9 et 7,9 dont la différence est 20, ce qui correspond en tout à 66 unités. Les 6^{cc} employés n'ont d'ailleurs pas d'influence sur 1^{cc} de sucrase normale.

6. 4^{cc} de liquide donnent respectivement 30,7 et 10, dont la différence est 20,7, ce qui fait 104 unités en tout. Même observation relativement à la sucrase normale.

8. L'essai avec 1, 2, 3, 4^{cc} donne, comme chiffres pour 1 et 2^{cc}, 25,2 et 37,8. Je recommence avec $1^{cc},2$, $1^{cc},3$ et $1^{cc},4$. Avec ce dernier volume, j'obtiens les chiffres 28,4 et 8,8 dont la différence est 19,7 correspondant à 285 unités en tout. Même observation.

Voyons maintenant à quelles considérations peuvent nous conduire les résultats que résume notre tableau ; ils nous fournissent toute une série de faits intéressants. Nous voyons d'abord que le sucre reste toujours, jusqu'à sa consommation complète, en partie à l'état de saccharose, bien qu'il y en ait une forte proportion à l'état de sucre interverti. L'acidité va en augmentant notablement d'abord, par suite de la formation bien connue

d'acide oxalique, puis en diminuant peu à peu, jusqu'à devenir à peu près nulle. Ces points intéressants, et qu'il était utile de signaler en passant, ne sont pas ceux qui doivent, pour le moment, attirer le plus notre attention; ce qui nous importe surtout, c'est la marche que suit l'apparition de la sucrase dans le liquide. Nous remarquons que sa quantité est relativement faible tant qu'il y a du sucre à consommer, mais qu'à partir du moment où le sucre devient rare la quantité de sucrase augmente rapidement, et devient au bout de 8 jours environ 6 fois ce qu'elle était le 3e jour. De plus, cette quantité de sucrase est insuffisante pour assurer dans la première période du développement, et dans les conditions de nos expériences de dosage, l'interversion de tout le sucre qui a disparu.

Nous nous trouvons donc en présence de ce fait singulier d'une substance qui se trouve dans le liquide en quantité insuffisante pour remplir le rôle qui lui est dévolu, et qui y apparaît, au contraire, en grande abondance, alors que sa présence est inutile et qu'il n'y a plus de matière à transformer. J'espère arriver peu à peu à donner dans ce qui va suivre une explication nette de ce fait en apparence paradoxal. Qu'il nous suffise, pour le moment, de l'avoir mis en lumière et de remarquer qu'il ne saurait s'accorder avec l'hypothèse qui tendrait à faire du liquide extérieur au végétal le siège de l'interversion ; si, au contraire, nous arrivons à établir que c'est dans l'intérieur des cellules que doit se passer ce phénomène d'interversion, que le sucre trouve dans ces cellules les conditions favorables à sa transformation, et que le passage de la diastase à l'extérieur est régi par une modification du contenu cellulaire qui rend sa diffusion de plus en plus facile, le fait que je viens de signaler n'aura plus lieu de nous étonner.

Nous voyons, en outre, dans nos expériences, un autre phénomène curieux. Le poids de la plante, qui va en augmentant à mesure que le sucre disparaît, et qui atteint son maximum au moment où cet élément nutritif est à peu près entièrement consommé, va ensuite en diminuant régulièrement, à mesure que la quantité de sucrase augmente dans le liquide. De plus, c'est la matière organique du végétal qui disparaît ainsi, car à partir du moment où il diminue de poids, le poids de ses cendres, c'est-à-dire de son squelette minéral, reste constant. A quel

phénomène intérieur correspond cette diminution de poids, qui coïncide extérieurement avec l'apparition de grandes quantités de sucrase dans le liquide? Je vais chercher à montrer que c'est à une consommation de réserves nutritives que les variations de poids du végétal rendent probable; cette probabilité est confirmée et par les caractères extérieurs de la plante et par son aspect microscopique.

Lorsque l'Aspergillus est arrivé à fructification complète, la culture a l'aspect florissant bien connu : son mycélium, très irrégulier et anfractueux à sa face inférieure, présente une dureté remarquable et une solidité telle qu'on peut soutenir la plante tout entière par un de ses angles sans qu'elle se déchire. Ces caractères disparaissent de plus en plus à mesure que la quantité de sucrase augmente dans le liquide; la plante se ramollit, son mycélium s'aplanit peu à peu en devenant de moins en moins anfractueux, de moins en moins dur; au bout d'un certain temps, sa face inférieure devient glaireuse et gluante; sa résistance à la rupture est de plus en plus faible, et il arrive un moment où le moindre effort suffit pour rompre la couche mycélienne et la disloquer. A ces caractères viennent s'ajouter ceux que révèle l'examen microscopique. A l'origine, le mycélium est tellement serré qu'il est très difficile à dissocier. Il présente de place en place des renflements qui semblent bourrés, ainsi qu'un grand nombre de points dans les tubes mycéliens, d'une matière qui se colore fortement en rouge brun par l'iodure de potassium iodé, réaction qui a été indiquée par divers auteurs comme étant celle du glycogène végétal et que M. Laurent a mise à profit dans son étude sur la formation et la disparition du glycogène chez la levure de bière[1]. Plus tard, cette réaction devient de moins en moins nette; l'iode ne produit plus qu'une coloration jaune uniforme, les renflements mycéliens semblent devenir de plus en plus rares ou confus, et les filaments mycéliens eux-mêmes, en particulier les plus gros, semblent vides et flétris; ils sont de diamètres très variables en des points rapprochés et sont repliés sur eux-mêmes. Tout concourt donc à nous confirmer dans cette opinion qu'il y a là une consommation de réserves, produite, comme je le montrerai plus loin, par un état de souffrance de la mucédinée.

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1889, p. 113.

Les expériences que je viens de rapporter peuvent soulever une objection. Elles sont faites dans des cuvettes en libre communication avec l'air extérieur, non stérilisées, et avec un liquide qui n'a lui-même subi aucune stérilisation. L'expérience apprend que ces conditions sont suffisantes pour mener une culture d'Aspergillus à bonne fin; il étouffe tous les êtres qui pourraient tenter de se développer à côté de lui, et, à moins que la semence employée ne soit vieillie et ne subisse dans son développement un retard notable, la culture est toujours pure. On peut objecter qu'il n'en est plus de même à partir du moment où les éléments nutritifs font défaut, et où le liquide est devenu de l'eau presque pure; dans ces conditions, les organismes extérieurs peuvent intervenir; il se produit une véritable macération d'Aspergillus qui, l'expérience me l'a montré, est un milieu de culture favorable à certains êtres. Les faits que nous observons pourraient donc être le résultat de la superposition d'un effet dû à l'Aspergillus et d'une sécrétion due à d'autres microbes présents. En réalité, il n'en est rien. Je dois d'abord dire que le liquide que surnage la plante reste toujours limpide ; mais nous devons répondre à cette objection d'une manière plus rigoureuse.

Expérience II. — Ces raisons m'ont conduit à faire des cultures en milieu stérile, non pas stérilisé par la chaleur, ce qui aurait pu produire une interversion partielle du sucre, et changer les conditions de l'expérience, mais dans un liquide Raulin stérilisé par filtration au travers d'une bougie Chamberland. Ce liquide est introduit par portions de 40cc, mesurées avec une pipette flambée, dans un certain nombre de fioles à fond très plat, fermées par un tampon de coton et flambées. Chaque fiole renferme :

Saccharose	1gr,7
Acide tartrique libre	0gr,066

c'est-à-dire environ 10 fois moins que chacune des cuvettes de notre première expérience. Ces fioles sont ensemencées aussi également que possible avec des spores d'Aspergillus cultivé à l'état de pureté. Voici les résultats de cette nouvelle expérience.

Durée.	Sacch. restant.	S. int. gr.	Sucre cons. gr.	Acidité. gr.	Sucrase.	Poids de plante. gr.
2	0	0,33	1,33	0,072	2,5	0,666
3	»	traces.	1,7	0,040	9	0,757
5	»	0	»	0	45	0,517
6	»	»	»	»	34	0,474
7	»	»	»	»	27	0,455

A partir du septième jour, la diminution de la sucrase, qui est vraisemblablement due à une oxydation, devient lente et très irrégulière si l'on passe d'une fiole à l'autre, de 24 heures en 24 heures, ce qui peut tenir à ce qu'une légère différence, existant à l'origine entre nos vases de culture, et s'accentuant avec le temps, a produit une différence notable dans la formation de la sucrase et dans son passage dans le liquide. Si, comme je le montrerai et comme les faits signalés permettent de le prévoir, ce phénomène est un fait de diffusion, il peut fort bien, envisagé sous ce jour nouveau, perdre le caractère de régularité qu'on eût été jusqu'ici autorisé à en attendre. J'ai d'ailleurs constaté, dans une expérience analogue à la première relatée, un passage notablement moindre de sucrase dans le liquide, sans qu'il m'ait été possible de saisir la cause certaine de cette diminution; je reviendrai dans la dernière partie de ce travail sur un fait analogue et sur l'explication que je crois pouvoir en donner. Revenons au tableau ci-dessus pour examiner le phénomène tant que sa marche est régulière.

Notons d'abord que cette nouvelle expérience diffère de la première en ce que l'aération de la plante est moins facile; de plus, le liquide est en couche plus mince, c'est-à-dire que le rapport entre sa surface et son épaisseur est plus considérable. Sans vouloir trop insister pour le moment sur cette circonstance, nous ne pouvons cependant nous empêcher de la rapprocher de ce fait que la plante a atteint son développement complet plus rapidement (la formation des spores commençait déjà au bout de 30 heures), le sucre a disparu plus vite, et la sucrase a passé dans le liquide en quantité relativement bien plus grande que dans la première expérience. Ce rapprochement est encore autorisé par une troisième série d'expériences, conduites en tout point comme les précédentes, ce qui me dispense d'en donner le détail, mais dans lesquelles les vases de culture étaient parcourus par un courant d'air destiné à maintenir constamment la plante en contact avec un excès d'oxygène. Dans ces conditions, bien que la diminution de poids du végétal se soit également produite, l'apparition de la sucrase dans le liquide a été très lente, et sa quantité plus faible; elle ne dépassait pas 12 unités à la fin du 5e jour; puis elle est montée à 30 unités, le 6e jour, pour décroître ensuite irrégulièrement.

En somme, si nous mettons de côté les différences que ces deux nouvelles séries d'expériences présentent au point de vue des quantités de sucrase, différences dont nous ne sommes pas encore prêt à donner une explication solidement établie, nous voyons que la marche du phénomène est la même lorsque l'Aspergillus est cultivé en liquide stérile ou dans des cuvettes: *la quantité de sucrase, très faible à l'origine, croît rapidement ensuite, à partir du moment où le sucre a disparu.*

De différentes causes qui provoquent l'apparition de la sucrase dans le liquide de culture de l'Aspergillus.

J'ai fait voir que l'apparition de la sucrase dans le liquide de culture de l'Aspergillus correspond à une consommation de réserves nutritives; comme cette consommation de réserves coïncide avec la disparition de l'aliment principal de la plante, on est conduit à penser que le passage de la sucrase à l'extérieur des cellules subit l'influence d'un état de souffrance de ces cellules. Je vais chercher à donner une preuve expérimentale de cette manière de voir; cette preuve expérimentale va en même temps répondre à une idée qu'on pourrait se faire sur la fonction diastasigène de l'Aspergillus, en se fondant sur des faits qui existent dans la science au sujet de cette fonction.

M. Wasserzug a étudié [1] une mucédinée du genre *Fusarium*, chez laquelle l'apparition de la sucrase coïncide avec la formation des conidies ; il ajoute, il est vrai, fort justement, que l'absence de sucrase dans le liquide ne permet d'émettre aucune opinion sur ce qui peut se passer dans l'intérieur des cellules. D'ailleurs, avec l'organisme de M. Wasserzug, la disparition du sucre marche très lentement, et la quantité de sucrase qui apparaît dans le liquide, autant qu'il est possible de conclure à cette quantité en envisageant la dose de sucre interverti présent, est toujours assez faible, de sorte qu'il y a là une grande différence avec ce que nous observons pour l'Aspergillus. Mais on peut considérer que ce n'est qu'une différence de doses, telle qu'on peut l'observer entre un organisme consommateur peu énergique de sucre et un organisme dont cette substance est, au contraire,

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1887, p. 525.

l'aliment de prédilection. Il y a lieu dès lors de se demander si, au point de vue de l'appariton de la sucrase dans le liquide de culture, l'Aspergillus n'est pas analogue au *fusarium*, et si la connaissance du travail auquel je viens de faire allusion ne pourrait pas conduire à une interprétation analogue. C'est, en effet, à partir du moment où les spores se forment, moment qui coïncide avec la disparition totale du sucre, que la sucrase commence à être abondante dans le liquide, de sorte que si, avec la tendance assez généralement répandue, on envisage le phénomène extérieur, constaté dans le liquide de culture, comme étant l'image plus ou moins lointaine de ce qui se passe dans les cellules de la plante, l'interprétation de M. Wasserzug semblera applicable ici.

Je vais faire voir que pour l'Aspergillus cette interprétation serait erronée ; le fait que nous avons observé est une coïncidence dans le temps, et nullement une coïncidence entre deux fonctions physiologiques ayant entre elles une relation de cause à effet; nous verrons en même temps apparaître l'influence de l'état de souffrance du végétal que je visais plus haut.

Tout d'abord, nous pouvons retarder l'apparition de la sucrase dans le liquide de culture en prolongeant le temps pendant lequel la mucédinée a de la matière alimentaire à sa disposition. Il suffit de prendre deux cultures identiques, âgées de 48 heures, période à laquelle la sucrase n'est présente dans le liquide qu'à une dose très faible. On décante ce liquide, on lave la plante à l'eau distillée, et on fait passer au-dessous de l'une des cultures de l'eau pure, au-dessous de l'autre de l'eau sucrée. Au bout de 36 à 48 heures, on trouve dans l'eau pure une quantité de sucrase notable, dans l'eau sucrée une quantité insignifiante. L'état d'inanition nous apparaît donc comme ayant une influence considérable sur l'apparition de la sucrase dans le liquide, et cette apparition peut suivre à une distance plus ou moins grande celle des organes fructifères.

Empêchons maintenant, par une expérience inverse, l'apparition de ces organes fructifères, en produisant en même temps un état de souffrance autre que celui que produit l'absence de matière alimentaire, nous n'en verrons pas moins apparaître la sucrase dans le liquide. Voici comment je suis arrivé à ce résultat. Dans 4 ballons à fond rond de 200 à 250 ^{cc} A, A′, B, B′, j'in-

troduis 100^{cc} de liquide Raulin; 40 heures après l'ensemencement, fait dans des conditions qui excluent toute intervention de microbes, la fructification n'ayant pas encore commencé, je remplace le liquide de A et A' par 200^{cc} d'eau pure; en B et B' j'ajoute 100^{cc} de liquide Raulin. A et B sont scellés avec la petite quantité d'air qu'ils renferment, et la plante est immergée ; A' et B' sont fermés vides d'air. Les 4 ballons ont donné un seul et même résultat; le développement de la plante reste stationnaire, et au bout de 48 heures, on trouve dans le liquide une quantité de sucrase notable, 35 à 45 unités par ballon. Nous voyons donc qu'ici l'apparition de la sucrase a été produite par des causes différentes de celles que nous avons mises en œuvre précédemment, l'immersion d'une part, l'absence d'oxygène de l'autre produisant toutes deux l'impossibilité de la fructification.

Il n'y a donc entre le fait de la formation des spores et celui de l'apparition de la sucrase dans le liquide de culture de l'Aspergillus aucune relation physiologique; de plus, nous sommes peu à peu conduit à cette conclusion que la sucrase semble se former dès l'origine dans les cellules, pour passer ensuite dans le liquide, dès que les conditions de la vie deviennent défavorables, quelle que soit d'ailleurs la période du développement de la mucédinée à laquelle interviennent ces conditions. Cette hypothèse nous conduit aussi à admettre que le phénomène d'interversion se passe dans l'intérieur des cellules, opinion qui est d'ailleurs d'accord avec les idées généralement acceptées. Cette opinion recevra un commencement de preuve expérimentale si, créant à l'Aspergillus des conditions dans lesquelles l'interversion du sucre en dehors de ses cellules devient difficile ou impossible, nous le voyons cependant arriver à un développement complet, après une ère de difficultés dont il aura fini par triompher.

Nous savons que le liquide Raulin a une acidité notable, et que si on offre à l'Aspergillus un liquide neutre, la première transformation chimique à laquelle donne lieu son développement est l'acidification du milieu par suite de la formation d'acide oxalique. Arrangeons-nous de manière à empêcher le liquide de devenir acide et à le rendre même légèrement alcalin. Il suffit pour cela de mettre de la craie au fond de notre vase de culture et de forcer un peu la dose de carbonate de potasse que le

liquide contient, en ayant soin d'éviter, de plus, qu'il renferme la moindre trace de sucre interverti. Dans ces conditions, le développement de l'Aspergillus est considérablement retardé ; le temps pendant lequel les spores ensemencées restent inertes à la surface du liquide peut aller jusqu'à 5, 6 et même 8 jours. Au bout de ce temps, les spores finissent par se développer, vraisemblablement aux dépens des éléments qu'elles apportent avec elles, comme elles le feraient dans l'eau pure, et dès que ce premier développement s'est produit, la culture suit son cours normal.

Ainsi donc l'acidité du milieu de culture n'est pas absolument nécessaire pour l'Aspergillus ; l'absence d'acidité lui crée toutefois des difficultés considérables qui amènent un retard notable dans son développement. Mais il faut remarquer que nous sommes ici en présence d'un producteur énergique de sucrase, et qu'avec un autre être le même fait pourra fort bien ne pas se produire : il pourra arriver que ces conditions défavorables à l'interversion qu'on lui crée à l'origine constituent pour lui une difficulté insurmontable, à moins qu'une petite quantité de sucre interverti, suffisante pour assurer le premier développement, ne soit présente dans la liqueur à l'insu de l'expérimentateur, ou ne puisse se produire par suite d'une légère acidité du milieu de culture. C'est là un fait intéressant que j'ai constaté avec la mycolevure de M. Duclaux, et sur lequel j'espère avoir l'occasion de revenir plus tard.

L'expérience que je viens de citer, ajoutée aux notions développées jusqu'ici, nous permet donc de supposer que tout le phénomène d'interversion se passe dans l'intérieur des cellules, et que la sucrase se forme dans ces cellules dès leur premier développement. Nous devons dès lors nous proposer de faire un pas de plus pour transformer en une certitude fondée sur l'expérience la probabilité acquise jusqu'à présent, et essayer de pénétrer dans l'intérieur de la cellule, pour étudier les matériaux que nous y rencontrerons.

Étude de la sucrase des cellules de l'Aspergillus.

Quels sont les moyens que nous avons à notre disposition pour étudier le contenu des cellules? Je ferai d'abord remarquer

que nous ne pouvons pas employer les procédés chimiques de destruction des enveloppes cellulaires qui ont été utilisés par Naegeli pour l'étude de la cellule de levure. La substance qui nous intéresse le plus pour le moment, la sucrase, ne résisterait pas à ce mode de traitement, qui exige le concours de la chaleur.

Un autre procédé mérite notre examen. Il est fondé sur une observation de M. Gayon[1], qui a reconnu que les dissolutions salines concentrées, en particulier, comme l'avait déjà vu Dumas, le tartrate neutre de potasse, facilitent considérablement la diffusion des matières albuminoïdes et de la sucrase renfermées dans les cellules des êtres inférieurs. J'ai cherché à mettre cette action à profit; elle m'a fourni quelques faits intéressants que j'indiquerai plus loin; mais pour le dosage de la sucrase intérieure, j'ai dû renoncer à ce procédé pour plusieurs raisons. D'abord le tartrate neutre de potasse, qui est le sel dont l'action est la plus énergique, n'enlève à la cellule qu'une partie de sa sucrase; de plus, son action retardatrice sur l'effet de cette sucrase est telle que le dosage déjà si délicat devient très difficile et ne peut se faire que par une voie très détournée et compliquée qui le rend beaucoup trop pénible. J'aurais pu essayer d'autres actions de substances chimiques; mais comme j'ai obtenu par un autre moyen des résultats qui, sans correspondre peut-être à des nombres absolument précis, fournissent cependant des chiffres comparables entre eux, je me suis arrêté à ce procédé, dans le détail duquel je vais entrer maintenant.

Ce procédé est mécanique; il consiste à broyer le végétal, lavé préalablement à l'eau distillée, non pas dans un mortier, mais à la molette sur un plan de verre, avec une petite quantité d'eau et de sable. On arrive ainsi, avec un peu de pratique, à transformer la mucédinée en une sorte de pommade très homogène dans laquelle l'examen microscopique révèle la rupture de presque toutes les cellules; nous trouverons d'ailleurs plus loin un autre critérium de la valeur de ce procédé. Tel qu'il est, il réussit avec l'Aspergillus, dont les cellules sont de dimensions relativement considérables, dimensions qui les rendent plus accessibles que celles d'autres êtres aux actions mécaniques. Le produit du broyage est mis en suspension dans l'eau distillée,

1. *Comptes rendus*, t. 102, p. 978.

avec une trace d'essence de moutarde destinée à prévenir son altération, et jeté sur un filtre. Je me suis toujours arrangé de manière à amener le liquide filtré, avec les eaux de lavage du filtre, à occuper le même volume que le liquide de culture auquel la mucédinée broyée avait été empruntée. On recueille ainsi dans ce liquide la presque totalité de la sucrase des cellules, et c'est là le critérium qui permet d'apprécier la valeur du procédé. Si, en effet, on rajoute de l'eau sur le filtre, on recueille dans le liquide qui passe, après cette opération qui, à cause de la lenteur de la filtration, peut être considérée comme une véritable macération et non comme un simple lavage, une quantité de sucrase dépassant rarement un dixième de la quantité renfermée dans le premier liquide; cette seconde quantité doit être ajoutée à la première dans l'évaluation de la sucrase totale. Après cette seconde filtration, la quantité de sucrase qui reste dans la mucédinée est absolument négligeable.

Le liquide ainsi recueilli a une acidité très faible. Cette constatation nous fait voir que le contenu des cellules a, du moins en certains points, une réaction acide, et que cette réaction est plus que suffisante pour neutraliser l'alcalinité des parties alcalines du protoplasma. En ces points acides, les conditions favorables à l'interversion par la sucrase et à sa conservation se trouvent réalisées.

Le liquide de broyage possède de plus une propriété sur laquelle j'aurai l'occasion de revenir plus tard: il présente les réactions de l'albumine, en particulier la propriété de donner un coagulum sous l'influence de la chaleur, mais le volume de ce coagulum semble devenir de moins en moins considérable à mesure que la plante avance en âge. J'aurai à mettre plus tard ce fait en relation avec un autre fait résultant d'expériences qui ne sont pas encore assez avancées pour que je les publie actuellement : c'est la plante toute jeune qui renferme le plus d'azote organique; sa teneur en azote va en diminuant notablement à mesure que son développement se poursuit.

Indépendamment de ces éléments et de la sucrase que nous étudierons tout à l'heure, le liquide de broyage de l'Aspergillus renferme, comme on pouvait s'y attendre, du sucre interverti. Il y a un fait plus inattendu, que je ne fais que signaler en passant ; ce liquide renferme du *saccharose* difficilement dosable

à cause de la présence de matériaux divers, entre autres de matières albuminoïdes. Mais l'action du tartrate neutre de potasse, auquel je reviens comme je l'annonçais plus haut, permet de vérifier l'exactitude de ce fait. Ce sel ne permet, en effet, qu'à un petit nombre d'éléments de se diffuser hors des cellules, et lorsque la plante est restée pendant quelques heures en contact avec lui, il arrive souvent qu'on a un liquide à sucrase non réducteur, mais qui prend un pouvoir réducteur énergique si on l'abandonne pendant quelques heures à la température de 56°, indice certain de la présence du saccharose. Il nous resterait à voir si ce fait se produit à toutes les périodes du développement de la mucédinée ; nous ne sommes pas encore en mesure d'examiner ce point. Mais si nous rapprochons le fait que je viens de signaler de ceux qui vont suivre, nous ne pouvons expliquer cette présence simultanée de sucrase et de sucre non interverti dans les cellules de l'Aspergillus qu'en admettant, soit la localisation de la sucrase dans certaines cellules, soit la localisation en certains points de la cellule des conditions favorables à l'interversion.

Après avoir examiné ces quelques propriétés du liquide de broyage de l'Aspergillus, tournons-nous du côté de la sucrase, et cherchons à voir à quelle époque et dans quelles proportions elle apparaît dans l'intérieur des cellules. J'ai mis en train, pour cette étude, 10 cultures d'Aspergillus aussi identiques que possible, dans des fioles à fond plat de 250cc, renfermant chacune 100cc de liquide de Raulin stérilisé par filtration. Chaque fiole renferme :

Saccharose	4gr,44
Acide tartrique libre	0gr,170

Au bout de 40 heures, je retire deux fioles de l'étuve, et à partir de ce moment, j'en retire deux nouvelles de 24 heures en 24 heures. Les deux fioles retirées de l'étuve renferment des cultures identiques ; leur identité est attestée par ce fait que la teneur en sucre, interverti ou non, des deux liquides de culture et leur acidité sont exactement les mêmes. L'une des fioles me sert à déterminer le poids du végétal que j'étudie dans l'autre en le broyant. Voici les résultats de cette étude ; en même temps que les chiffres relatifs à la sucrase, je donne tous les renseignements que j'ai déjà indiqués à l'occasion d'autres expériences,

parce qu'ici l'examen a eu lieu régulièrement et à des périodes plus rapprochées de l'origine de la culture, de sorte que ces nouvelles données complètent, dans une certaine mesure, les anciennes.

Durée.	Sacch. restants.	S. int.	Sucre cons.	Acidité.	Sucrase du liquide.	Sucrase des cellules.	Poids de plante.
	gr.	gr.	gr.	gr.			gr.
1	1,36	2,36	0,92	0,293	2	58	0,65
2	0,22	1,65	2,57	0,368	3	47	1,265
3	0	0,7	3,74	0,267	5	45	1,78
4	»	0	4,44	0,143	10	44	1,65
5	»	»	»	0,135	13	35	1,61

D'autres expériences, que j'omets pour ne pas allonger inutilement cet exposé, conduisent à des conclusions tout à fait comparables à celles que nous avons maintenant à mettre en lumière; je n'insiste que sur les faits relatifs à la sucrase, les autres nous étant déjà suffisamment connus.

Nous voyons nettement que la quantité maximum de sucrase présente dans les cellules apparaît dès l'origine, dès le premier développement de la mucédinée. Cette quantité va ensuite en décroissant lentement et assez régulièrement dans ces cellules, en même temps qu'il en passe au dehors des quantités de plus en plus grandes. Mais il faut remarquer que la somme de la sucrase extérieure et intérieure n'atteint pas le chiffre initial, et va, au contraire, en diminuant assez régulièrement, sauf variation de quelques unités. Quel que soit le mécanisme de cette décroissance, qui correspond peut-être à une destruction partielle de sucrase incomplètement compensée par une formation nouvelle, nous nous trouvons en présence de ce fait curieux que toute la sucrase que la plante pourra élaborer se trouve, comme quantité, formée dès l'origine du développement. Il est important de constater en outre que les variations de la somme de la sucrase du liquide et des cellules, qui sont assez faibles, ne suivent nullement les variations de poids de la plante, qui sont considérables. Ainsi cette somme qui était 60 à l'origine de la culture et correspondait à un poids de plante de $0^{gr},65$, tombe à 50, alors que le poids de la plante s'élève à $1^{gr},25$.

La constatation de ce fait nouveau a d'autant plus d'importance qu'elle sert, pour ainsi dire, de clef à tous les phénomènes complexes que nous avons présentés jusqu'ici. La forma-

tion de la sucrase dans les cellules se présente à nous comme suivant une marche toute différente, inverse de celle que nous avons observée pour son apparition dans le liquide de culture, et la contradiction apparente que nous avons notée, lorsque nous avons étudié ce dernier phénomène, entre la formation abondante de diastase et l'absence de l'élément qu'elle doit transformer, ne subsiste plus. Tout ce qui se passe dans le liquide de culture relativement à cette apparition de la sucrase doit se résumer pour nous en un phénomène de diffusion, et si nous nous reportons à ce que nous avons vu au sujet de la consommation des réserves nutritives, la diffusion nous apparaît comme devenant de plus en plus facile à mesure que les éléments présents dans l'intérieur des cellules vont en disparaissant.

On voit, en somme, quelle complexité présentent tous ces phénomènes, et combien il faut être prudent dans leur interprétation. Les faits que nous avons cherché à mettre en lumière nous montrent en particulier qu'on ne doit pas se hâter de conclure qu'un être ne fabrique pas de sucrase parce qu'on n'en trouve pas dans son liquide de culture; en effet, même pour l'Aspergillus, qui peut être considéré comme un producteur puissant de sucrase, au moment où le liquide de culture n'en renferme que des traces insignifiantes, les cellules en contiennent des quantités considérables si on les compare au poids de sucre qu'elles ont à intervertir. Il ne faudrait pas conclure davantage de ce que la sucrase apparaît plus tard en quantité notable dans le liquide, que cette apparition coïncide avec celle d'une fonction diastasigène nouvelle; il pourra même se faire qu'à ce moment les cellules renferment beaucoup moins de diastase qu'à l'origine.

Nous pouvons maintenant essayer d'étendre à d'autres espèces les notions que nous venons d'établir pour l'Aspergillus, et qu'on peut résumer dans les conclusions suivantes. Les produits qu'on trouve dans le liquide de culture d'un organisme peuvent ne donner qu'une idée très éloignée de ce qui se passe dans la cellule elle-même ; comme c'est dans la cellule que la matière alimentaire devient assimilable, c'est là que doivent être localisées les diastases destinées à opérer cette transformation et c'est là qu'il faut s'efforcer d'aller les chercher. Sans doute, le pro-

blème que nous nous étions proposé de résoudre au début de ces recherches, à savoir de suivre la marche de la sécrétion d'une diastase par un organisme déterminé, devient de plus en plus délicat; mais il nous semble que si nous n'avons pas encore à notre disposition tous les moyens à mettre en œuvre pour atteindre notre but, la connaissance du point où il faut s'appliquer à chercher ces diastases nous rapproche cependant de la solution.

DEUXIÈME PARTIE

LA SUCRASE DE LA LEVURE

Après avoir étudié l'*Aspergillus Niger* au point de vue de la formation de la sucrase, j'ai été tout naturellement conduit à rechercher si des faits analogues à ceux que je viens de mettre en lumière ne se retrouveraient pas avec d'autres êtres. Je me suis adressé pour cette étude à la levure, qui a servi d'ailleurs de source de sucrase à tous ceux qui se sont occupés de cette diastase. La raison principale qui m'a déterminé à choisir ce végétal, en dehors de l'intérêt qu'il présente en lui-même, c'est que, m'étant occupé jusque-là d'un être essentiellement aérobie, l'*Aspergillus Niger*, il était particulièrement intéressant de savoir comment, chez un être capable de mener indifféremment la vie aérobie ou la vie anaérobie, ces deux modes différents d'existence retentiraient sur la fonction diastasigène. On verra plus loin comment je me suis trouvé contraint d'abandonner cette partie du problème, à laquelle j'estime qu'il est impossible de donner une solution précise. Mais si la question s'est restreinte et simplifiée de ce côté, elle s'est considérablement étendue et compliquée à d'autres points de vue, si bien que j'ai dû choisir entre les nombreuses voies qui s'ouvraient devant moi, et me borner à y poser quelques jalons, pour ne résoudre d'une manière complète que la seule question du dosage de la sucrase.

Il est clair, en effet, qu'une méthode précise de dosage pou-

vait seule me conduire, pour la levure comme pour l'Aspergillus, à avoir une idée nette de la formation de la sucrase. Il m'a donc fallu tout d'abord étudier les propriétés de l'invertine ou sucrase de la levure, en m'attachant surtout dans cette étude aux points particuliers qui pouvaient conduire à un procédé de dosage. Rien ne permettait, en effet, d'admettre *a changer* que la sucrase de la levure était identique à la sucrase de l'Aspergillus, ou même très voisine de cette sucrase; l'expérience m'a montré, au contraire, que non seulement il n'y a pas identité, mais qu'à côté de grandes ressemblances il y a des différences très notables : chaque race de levure semble même élaborer sa sucrase particulière, ou tout au moins les conditions les plus favorables à l'action de cette sucrase varient d'une race à l'autre, circonstance qui, dès le début de notre étude, vient déjà la compliquer singulièrement.

I

PROPRIÉTÉS DE LA SUCRASE DE QUELQUES LEVURES.

Parmi les levures qui m'ont servi dans ce travail, une seule, celle dont je parlerai en commençant, était une levure commerciale, et m'a servi pour quelques essais. J'ai dû préparer cette même levure et les autres en assez grande quantité, une centaine de grammes au moins de chacune, en partant d'une colonie formée sur gélatine et issue d'une seule cellule. Je me suis servi pour cette préparation d'un appareil que j'ai décrit ailleurs [1]. La levure obtenue, recueillie dans des conditions de pureté dans un vase stérile, a toujours été séparée du liquide dans lequel elle se trouvait en suspension, et lavée à l'eau stérile, au moyen d'un dispositif spécial que je décrirai brièvement. Un tube à essai large et résistant est fermé par un bouchon en caoutchouc à deux trous. Dans l'un des trous s'engage une petite bougie Chamberland, dont l'extrémité bouchée descend jusqu'au fond du tube; l'extrémité ouverte, qui affleure au niveau de la portion libre du bouchon de caoutchouc, est munie d'un bouchon et d'un tube qu'on peut mettre en relation avec un vase dans lequel on fait le vide. L'autre trou du bouchon de caoutchouc porte un entonnoir à boule, à large douille, fermé par un tampon de

1. *Bulletin de la Société chimique*, 3e série, t. 4, p. 113.

coton. On chauffe tout l'appareil dans la vapeur, à 120°; puis on introduit la bouillie de levure par le tube à boule, après avoir enlevé le tampon de coton, et on remplace le liquide qui passe à travers la bougie par de l'eau stérile. On peut ainsi prolonger le lavage jusqu'à ce qu'il ne passe plus à travers la bougie que de l'eau pure. On remet alors par agitation la levure en suspension dans l'eau, et au moyen d'une pipette flambée on la verse dans un vase flambé dans lequel on peut la laisser macérer sans crainte de la voir s'altérer et sans qu'il soit nécessaire d'ajouter un antiseptique.

Levure de Tantonville.

Comme je viens de le dire, la levure qui m'a servi tout au début de mes recherches est une levure commerciale, qu'on m'a donnée comme provenant de la brasserie de Tantonville. L'origine même de cette levure n'a aucune importance pour le sujet qui nous occupe; mais, à défaut de preuve expérimentale directe, j'ai cependant lieu de croire que cette levure joue dans la fabrication de la bière de Tantonville un rôle important; aussi la désignerai-je dans ce qui va suivre sous le nom de levure de Tantonville, me proposant simplement d'abréger ainsi le langage, et sans vouloir attacher à cette désignation aucune idée certaine d'origine.

La levure de Tantonville, telle que je l'ai trouvée dans le commerce, ne présentait aucun caractère microscopique bien tranché : ses globules, de forme légèrement ovoïde, avaient une grande régularité dans leurs dimensions; leur aspect était celui d'une levure basse bien caractérisée. Une étude attentive de cette levure m'a montré qu'elle était composée presque exclusivement d'une seule race, et cette remarque s'est trouvée confirmée par la suite, dans une certaine mesure, par l'identité entre les caractères de sa sucrase et ceux de la sucrase d'une levure que j'ai préparée moi-même en assez grande quantité et à l'état de pureté en prenant comme semence une cellule de la levure commerciale. L'un des caractères les plus curieux de cette levure, c'est l'aspect extérieur de ses cultures : la levure forme au fond du vase où on la cultive un dépôt tellement compact et adhérent, qu'on peut décanter tout le liquide sans entraîner une quantité de levure

suffisante pour en troubler la limpidité, et qu'il faut une agitation énergique et prolongée pour détacher ce dépôt. Le même caractère se retrouve, mais moins nettement accusé, chez une levure que j'ai extraite il y a quelques années d'une lie de vin de Champagne, et qui est bien connue depuis dans le laboratoire de M. Duclaux sous le nom de levure de Champagne.

Avant de passer à l'étude de la sucrase de la levure de Tantonville, je crois utile de signaler un fait curieux que j'ai eu l'occasion d'observer avec cette levure. Bien qu'il soit un peu en dehors du cadre de ce travail, j'estime cependant qu'il est intéressant à connaître, parce qu'on peut être conduit, si on l'ignore, à des conclusions tout à fait erronées relativement à la sécrétion de la sucrase. L'eau de levure à laquelle on incorpore un élément nutritif, sucre ou autre, est un milieu fréquemment employé dans la culture des microbes; M. Pasteur en a depuis longtemps indiqué la préparation et l'emploi. J'ai eu l'occasion de préparer de l'eau de levure sucrée avec saccharose : après avoir fait bouillir de la levure de Tantonville pendant un *quart d'heure* avec 5 à 10 fois son poids d'eau, je filtrais ; après refroidissement, j'ajoutais du sucre de canne et je stérilisais par filtration au travers d'une bougie Chamberland. Dans un liquide préparé de cette manière, j'ai été tout surpris de trouver au bout de quelques jours le sucre interverti en majeure partie, bien qu'aucun microbe introduit accidentellement ne fût intervenu. Le phénomène de l'interversion du sucre ne pouvait être rapporté qu'aux propriétés de l'eau de levure elle-même. Une étude attentive des conditions de la préparation de cette eau de levure m'a fourni l'explication suivante de ce fait qui m'avait d'abord paru surprenant. La sucrase se trouve dans le contenu du globule de levure dans des conditions qui lui permettent de résister bien mieux à l'action de la chaleur que lorsqu'elle est en solution dans un liquide, de telle sorte que lorsqu'on maintient de l'eau en ébullition avec de la levure pendant un quart d'heure, une partie seulement de cette sucrase est détruite. Si, lorsque l'ébullition cesse, la levure reste encore pendant quelque temps en contact avec le liquide, la sucrase intérieure se diffuse à l'extérieur, et reste inaltérée dès que la température est descendue assez bas, c'est-à-dire au voisinage de 70 ou 75°. A partir de ce moment, le liquide aura des

propriétés inversives d'autant plus énergiques que le contact avec la levure sera prolongé davantage. Voici des expériences qui prouvent nettement les faits que j'avance.

Deux lots égaux de levure ont été bouillis avec dix fois leur poids d'eau pendant un quart d'heure. L'un d'eux (A) a été refroidi brusquement, l'autre (B) a été abandonné au refroidissement spontané. Au bout d'une heure et demie, j'ai filtré les deux infusions et fait agir 5^{cc} de chacune sur 5^{cc} d'une solution de saccharose à 50 0/0, pendant trois heures, à la température de 56°. J'ai trouvé les quantités suivantes de sucre interverti :

A	$15^{cgr},6$
B	7,2

Une autre expérience, conduite de même, dans laquelle A a été filtré au bout de vingt-quatre heures, et B a été filtré bouillant, m'a donné les quantités de sucre interverti suivantes après trois heures à 56° :

A	$22^{cgr},5$
B	traces indosables.

Pour arriver au résultat obtenu avec B, il a fallu le filtrer rapidement sur un entonnoir à filtration chaude : la température, au moment où le liquide était versé sur le filtre, était de 98°; à la sortie, elle était de 86°. En conduisant la filtration moins rapidement et permettant au mélange d'eau et de levure de se refroidir davantage, on obtient un liquide peu actif, il est vrai, mais qui, avec le temps, est encore capable d'intervertir des quantités de sucre considérables. Dans tous les cas, le liquide filtré perd ses propriétés inversives lorsqu'il a été bouilli.

On voit de suite l'intérêt que peut avoir la connaissance de faits de cet ordre. Faute de les avoir élucidés, on peut être conduit, en cultivant un micro-organisme dans une eau de levure préparée comme celle dont je viens de citer l'exemple, à attribuer à cet être une fonction diastasigène qu'il peut fort bien ne pas posséder.

J'arrive maintenant à l'étude de la sucrase de la levure de Tantonville, sucrase que j'ai obtenue par la méthode généralement employée, en laissant macérer la levure à froid avec de l'eau. Pendant cette macération, il se passe un fait sur lequel j'aurai à revenir plus loin, et que je me contente de signaler

brièvement ici : il faut d'autant plus de temps à la sucrase pour se diffuser dans l'eau de macération que la levure est plus jeune; comme dans le cas de l'Aspergillus, le phénomène de diffusion ne devient très actif que lorsque la levure a vieilli et a commencé à consommer ses réserves nutritives.

J'ai étudié les macérations obtenues, ainsi que je l'ai dit plus haut, d'une part avec la levure commerciale, de l'autre avec de la levure pure que j'ai préparée moi-même, m'occupant surtout du rôle que peut avoir la présence de la soude ou de l'acide acétique dans l'interversion du sucre. C'est surtout cette dernière influence que je me suis attaché à déterminer avec grand soin, le procédé de dosage reposant sur cette étude. Comme les faits que j'ai à signaler ici se rapprochent beaucoup de ceux que j'ai indiqués pour l'*Aspergillus Niger*, je serai bref et me contenterai de quelques chiffres expérimentaux ; le mode opératoire a toujours été celui que j'ai indiqué précédemment à propos de la sucrase de cette mucédinée.

Comme la sucrase de l'Aspergillus, la sucrase de la levure est très sensible à la présence de doses très faibles d'alcali, dans des limites où l'alcalinité est difficilement appréciable aux papiers réactifs. Voici des chiffres qui le prouvent [1].

Nos d'ordre des expériences.	Soude présente, en millionièmes.	Sucre interverti, après 1 heure, à 55°.
1	0	26,0
2	4	20,9
3	5	18,0
4	6	17,5
5	10	11,1

Cette similitude de propriétés avec la sucrase de l'*Aspergillus Niger* nous dispense d'insister plus longuement. L'étude de l'influence de l'acide acétique mérite de nous arrêter davantage. Ici, j'ai, comme pour l'Aspergillus, retranché de la quantité totale de sucre interverti par la diastase en présence d'acide celle que l'acide peut intervertir seul dans les mêmes conditions. Mais comme j'ai eu affaire à des doses d'acide beaucoup plus faibles, c'est-à-dire capables d'intervertir seules une quantité de sucre beaucoup moins grande qu'avec l'Aspergillus, je n'ai pu doser

1. Ainsi que je l'ai fait précédemment, j'exprime toujours le sucre interverti en centigrammes de saccharose.

cette dernière quantité directement, et j'ai dû, après avoir déterminé le pouvoir réducteur du liquide du premier de mes tubes d'expérience, renfermant l'acide et la diastase, chercher le pouvoir réducteur du second, renfermant l'acide seul, en complétant avec le premier liquide la réduction de la liqueur de Fehling commencée avec un volume déterminé du second. Voici les résultats que j'ai obtenus :

Doses d'acide en millièmes.	Levure commerciale		Levure pure	
	I.	II.	III.	IV.
0	45,4	»	»	»
0,01	51,8	90,3	»	»
0,02	60,2	105,6	40,6	78,8
0,05	114,2	130,2	47,4	81,7
0,1	130,2	136,8	48,2	82,9
0,2	**133,3**	**138,2**	**48,6**	**84,3**
0,5	130,2	134,9	47,0	84,2
1	124,0	131,9	46,6	82,3
2	»	»	»	81,1

Si l'on continue à augmenter la dose d'acide, comme je l'ai fait dans d'autres séries d'expériences que j'omets pour ne pas accumuler les chiffres, on arrive rapidement à une dose paralysante.

En comparant ces chiffres à ceux d'un tableau analogue que j'ai donné à propos de l'Aspergillus, nous remarquons immédiatement une différence considérable. La sucrase de la levure de Tantonville est beaucoup plus sensible à l'action de l'acide, et la dose d'effet maximum, qui pour l'Aspergillus était de $\frac{1}{100}$, est abaissée ici à 0,2 ou $\frac{1}{5000}$: elle est 50 fois moindre. Au voisinage de cette dose, les variations sont également très faibles, mais il faut remarquer que les variations des doses d'acide sont beaucoup moins notables que dans le cas de l'Aspergillus : pour préciser autant que possible la situation du maximum, j'ai adopté une échelle de variations beaucoup moins rapides. On voit de plus que le maximum correspond à la même dose d'acide pour la levure commerciale et pour la levure pure que j'ai préparée ; les propriétés de leurs sucrases sont les mêmes à ce point de vue, et très probablement la levure commerciale était presque uniquement constituée par la race de levure que j'en ai extraite.

Nous venons de voir une différence capitale dans les pro-

priétés des sucrases de deux êtres microscopiques. La sucrase de la levure de Tantonville partage avec celle d'autres levures dont je parlerai une autre propriété qui la sépare nettement de celle de l'Aspergillus: elle passe presque intégralement au travers des filtres en porcelaine, propriété précieuse pour sa conservation et que nous n'avions pu utiliser avec l'Aspergillus; je rappelle, en effet, que la sucrase de cet organisme est au contraire retenue presque complètement par ces filtres. Pour éviter toutes les causes de variation qui peuvent intervenir dans ces phénomènes de filtration et peuvent amener divers expérimentateurs à se prononcer différemment sur la manière dont se comporte un liquide déterminé, je me suis astreint à opérer toujours les filtrations dans des conditions aussi comparables que possible, en ayant soin de maintenir toujours entre les deux parois de la bougie une différence de pression d'une atmosphère.

Voici un exemple des propriétés de la sucrase de la levure de Tantonville au point de vue de la filtration. Le liquide qui a fourni les nombres de la colonne III du tableau, a donné après filtration, en présence de $\frac{1}{5000}$ d'acide acétique, 43^{cgr},9 au lieu de 48^{cgr},6; c'est une diminution d'un dixième de son activité environ.

Saccharomyces Pastorianus, levures de pale-ale et de Champagne.

J'ai fait également macérer dans l'eau une certaine quantité de ces levures obtenues par culture dans du moût de bière ou dans de l'eau de touraillons sucrée. Je n'ai, il est vrai, employé ce dernier milieu que pour le *Saccharomyces Pastorianus;* on verra plus loin que le moût de bière est bien plus favorable pour produire une levure riche en sucrase que n'importe quel autre milieu à saccharose ou à maltose, du moins pour les trois levures dont je vais maintenant étudier la sucrase; c'est là un point qui mérite que nous nous y arrêtions plus longuement, quand nous aurons acquis les notions qui nous permettront de l'examiner.

Le *Saccharomyces Pastorianus* dont je me suis servi provenait du rajeunissement de celui qui a servi à M. Pasteur dans ses Études sur la bière; il en est de même de la *levure de pale-*

ale, levure haute bien caractérisée. Voici un tableau qui indique l'influence de l'acide acétique sur l'action de leur sucrase; j'y ajoute ce qui est relatif à la levure de Champagne.

	Lev. de Champagne.	Saccharomyces Pastorianus.		Lev. de pale ale.
Doses d'acide.	Moût de bière.	Moût de bière.	Eau de tour. sucrée.	Moût de bière.
0	38,3	29,7	4,4	18,8
0,02	38,7	31,9	»	19,8
0,05	63.9	32,4	»	22,3
0,1	74,3	32,4	16,9	25,5
0,2	**79,4**	32,9	23,0	28,3
0,5	78,4	**33,0**	**23,4**	**29,4**
1	75,0	31,3	23,3	28,9
2	71,9	29,6	21,5	27,6
5	»	»	16,7	»
10	50,4	»	0,0	»

On voit que l'optimum pour la levure de pale-ale et pour le Saccharomyces Pastorianus correspond sensiblement à la même dose $\frac{1}{2000}$. Quant à la levure de Champagne, elle présente un maximum au même point que la levure de Tantonville, $\frac{1}{5000}$; peu sensible à des doses d'acide très faibles, sa sucrase agit très énergiquement ensuite, lorsque la dose atteint $\frac{1}{20000}$. Les sucrases de ces trois levures ont en outre la propriété de passer en totalité au travers des filtres en porcelaine.

En somme, nous voyons que, lorsqu'on passe d'un organisme à l'autre, il y a place pour de très grandes variations dans les propriétés de la sucrase; même chez des êtres plus voisins, les levures, il y a certaines différences, faibles il est vrai, mais qui n'en sont pas moins importantes à considérer. Nous nous trouvons, avec l'Aspergillus d'une part et les levures de l'autre, en présence de sucrases qui occupent les deux extrémités dans l'échelle de sensibilité aux diverses doses d'acide, et on trouverait très probablement des termes intermédiaires. Peut-être cette sensibilité est-elle en relation avec le mode de nutrition de la cellule, comme l'est la formation de sucrase elle-même; c'est là une hypothèse qui prend une certaine vraisemblance quand on considère que, dans le laboratoire, nous sommes habitués à cultiver l'Aspergillus dans un milieu d'acidité notable, tandis que nous employons généralement des milieux presque neutres pour la culture des levures.

II

DOSAGE DE LA SUCRASE CHEZ LA LEVURE. DÉFINITION GÉNÉRALE DE L'UNITÉ DE SUCRASE.

Maintenant que nous connaissons certaines propriétés de la sucrase de quelques levures, nous pouvons nous proposer de voir quelle marche suit la formation de cette sucrase, en cherchant d'abord à fonder sur ce que savons un procédé de dosage précis. Nous profiterons pour y arriver des notions que j'ai développées à propos de l'Aspergillus Niger.

Qu'appellerons-nous d'abord *unité de sucrase?* Pour nous conformer à la définition que j'ai donnée antérieurement, et nous placer toujours, comme je l'ai fait jusqu'ici, dans les conditions les plus favorables à l'interversion, nous dirons d'une manière générale : *L'unité de sucrase est une quantité de sucrase telle qu'elle intervertit* 20 *centigrammes de sucre en* 1 *heure, à la température de* 54-56°, *en présence de la dose d'acide acétique qui favorise le plus l'interversion.* C'est là une légère modification de notre définition première, qui la rend générale, et permet de tenir compte des variations de la dose optimum d'acide, suivant les organismes. MM. O'Sullivan et Tompson ont insisté après moi, dans un travail récent [1], sur l'importance qu'il y a à employer cette dose d'acide.

Une fois cette notion d'unité établie, qu'aurons-nous à faire pour doser la sucrase? Il nous suffira d'opérer exactement comme nous l'avons fait pour l'Aspergillus : chercher quel est le volume de liquide à employer pour intervertir en 1 heure, à 54-56°, 20 centigrammes de sucre, en présence de la dose d'acide acétique la plus favorable à l'interversion par la sucrase étudiée. A part le changement dans la dose d'acide, tout le reste du dosage sera conduit absolument de la même manière, en employant les mêmes précautions pour arriver à un chiffre précis.

J'ai cependant un point important à développer relativement

1. Invertase : A contribution to the history of an enzyme or unorganised ferment; C. O'Sullivan et F. W. Tompson. *Proceedings of the Chemical Society,* 19 juin 1890, et *Journal of the Chemical Society,* octobre 1890.

au dosage de la sucrase contenue dans l'intérieur des cellules de levure. Ici, le dosage est beaucoup plus long et surtout plus délicat que lorsqu'il s'agissait de l'Aspergillus; il suffisait en effet, pour extraire la sucrase des cellules de la plante, de la broyer avec de l'eau et du sable. J'ai essayé d'appliquer le même mode opératoire à la levure, en la broyant avec de l'émeri, mais je n'ai point obtenu de résultat satisfaisant. On arrive bien par le broyage à déchirer quelques cellules, mais, si longtemps qu'on le prolonge, on en laisse la majeure partie intacte; et même si l'on pouvait y arriver, il y aurait une difficulté matérielle insurmontable à amener sur un plan de verre toutes les cellules d'une culture et à ne point en perdre une portion notable pendant le broyage lui-même. J'ai donc dû avoir recours à un autre procédé que je vais exposer.

Le moût dans lequel la levure s'est développée est décanté avec précaution au moyen d'une pipette flambée. Avec un peu d'habitude, on arrive à faire cette opération délicate sans entraîner, même avec les levures les plus défavorables, qui ne forment pas de dépôt très adhérent au fond du vase, une proportion notable de cellules. Cette quantité, que j'ai pris la précaution de déterminer toutes les fois qu'un léger trouble du liquide décanté accusait un entraînement de levure, ne s'est que rarement élevée à plus de un ou deux milligrammes, poids généralement négligeable au regard de la totalité de la levure récoltée; dans quelques cas, le poids de levure entraînée a été plus considérable, et alors j'en ai tenu compte en introduisant dans le calcul de la quantité totale de sucrase un terme de correction. Lorsqu'on a décanté la majeure partie du liquide de culture et qu'on ne peut en enlever davantage sans craindre d'entraîner en même temps une proportion notable de levure, il est toujours facile, en mesurant le volume de liquide décanté, de savoir, connaissant le volume primitif, quelle est la quantité de liquide laissée en contact avec la levure, et, s'il y a lieu, de tenir compte, dans la mesure de la sucrase totale, de celle que ce liquide renferme. Sur le dépôt de levure qui reste au fond du vase de culture on verse de l'eau stérile renfermée dans un ballon-pipette, et on met, par agitation, la levure en suspension dans cette eau. Puis on aspire le liquide dans un tube Pasteur à une branche, en observant toutes les précautions qui assurent

la stérilité dans le transvasement. De l'eau stérile ajoutée à plusieurs reprises dans le vase de culture permet d'en extraire toute la levure, qu'on abandonne ensuite, à une température de 30 à 35°, après avoir eu soin de sceller le tube vide d'air, afin d'éviter les phénomènes d'oxydation auxquels la sucrase est très sensible et qui en détruiraient infailliblement une proportion notable au fur et à mesure de sa diffusion. Au bout de quelques jours, et en général d'un temps dont je donnerai plus loin une mesure plus précise, on retire le tube de l'étuve, on brise la pointe effilée qui le surmonte pour permettre à l'air d'y rentrer au travers du coton; puis on brise l'effilure latérale et on décante avec précaution dans une éprouvette graduée le liquide limpide qui surmonte le dépôt de levure. On s'arrête au moment où ce liquide commence à entraîner de la levure, sans s'occuper d'ailleurs du volume qui reste dans le tube. On lit le volume du liquide décanté et on y dose la sucrase. Quant au tube, on y aspire une nouvelle quantité d'eau stérile, dans laquelle on met la levure en suspension; on referme le tube après y avoir fait le vide, et on recommence l'opération que je viens de décrire jusqu'à ce que le liquide qu'on décante ne renferme plus de sucrase, ou n'en renferme qu'une quantité négligeable. Il suffit alors de faire la somme des quantités partielles de sucrase trouvée pour avoir la quantité totale de sucrase présente dans les cellules.

Tel est le procédé auquel j'ai dû m'arrêter. Sans doute, on pourrait trouver des méthodes plus simples pour extraire la sucrase de l'intérieur du globule de levure; mais je ferai remarquer que mon but a été de doser la totalité de cette sucrase, et je ne vois pas quel autre moyen on pourrait employer sans s'exposer à des pertes notables. D'ailleurs la complication de la méthode et le temps nécessaire pour arriver au terme final, temps qui, pour une récolte de levure riche en sucrase, dépasse quelquefois un mois, ne sauraient entrer en balance avec la sécurité des résultats obtenus. Je ne parlerais même pas de cette complication si je ne voulais donner une idée du travail considérable qu'a exigé l'étude que j'exposerai plus loin, et répondre ainsi par avance au reproche qu'on pourrait me faire de ne pas avoir étendu davantage le champ de mes investigations.

Quelques détails relatifs aux phénomènes qui accompagnent la macération de levure dans l'eau compléteront utilement cet exposé. A l'origine, la levure présente nettement, lorsqu'on la traite par l'iode, la réaction du glycogène végétal dont j'ai déjà eu occasion de parler précédemment; elle perd peu à peu cette propriété de se colorer en rouge-brun, et lorsqu'elle n'abandonne plus de sucrase à l'eau, elle ne donne plus lieu à cette réaction. Le contenu cellulaire a peu à peu disparu et, sauf l'existence de quelques granulations intérieures, les globules de levure sont réduits à leurs enveloppes; ils apparaissent au microscope comme des sacs vides très peu réfringents et assez peu résistants pour devenir polyédriques par pression réciproque lorsqu'ils sont serrés les uns contre les autres. Ces cellules sont mortes pour la plupart; même en ensemençant la levure très largement dans un milieu favorable à son rajeunissement, on la voit se développer tout au plus une fois sur deux ensemencements.

La diffusion de la sucrase dans l'eau suit une marche régulière dont on se rend facilement compte lorsqu'on décante le liquide surnageant la levure à des intervalles réguliers, par exemple tous les cinq ou six jours. Lorsque la levure est riche en sucrase et sort d'une culture assez jeune, c'est-à-dire d'un milieu où la matière fermentescible n'est pas encore complètement consommée, le premier épuisement par l'eau fournit toujours un liquide moins riche en sucrase que le second ; quelquefois celui-ci en renferme même moins que le troisième; puis la quantité de sucrase va en décroissant jusqu'au moment où elle devient nulle à mesure qu'on multiplie les épuisements. Le renouvellement de l'eau, au bout d'un intervalle de cinq à six jours, m'a semblé être le plus favorable à la conduite la plus rapide de l'opération du dosage. Il s'établit, en effet, entre le contenu des cellules et le liquide extérieur, un état d'équilibre qui est atteint au bout de ce temps, et on ne gagne presque rien à prolonger la durée de l'épuisement.

Les quelques caractères généraux que je viens de passer en revue seront mis tout à l'heure en lumière dans l'étude de chaque levure, que je vais aborder maintenant

III

ÉTUDE DE LA FORMATION DE LA SUCRASE CHEZ QUELQUES LEVURES CULTIVÉES DANS LE MOUT DE BIÈRE.

L'étude particulière des faits observés avec chacune des levures que j'ai étudiées doit être précédée de quelques indications sur les conditions dans lesquelles j'ai fait mes expériences. De tous les milieux dont j'ai essayé l'emploi, le moût de bière houblonné ordinaire, préparé en saccharifiant le malt à 60 ou à 63°, s'est presque toujours présenté comme étant le plus favorable à la formation de la sucrase. J'aurai à revenir sur les propriétés que présentent d'autres milieux relativement à cette formation. Je voudrais insister dès mainteuant sur la singularité apparente que présente la formation de sucrase dans un milieu où l'on ne voit pas son utilité. J'ai constaté, en effet, après M. Bourquelot[1], que la sucrase de la levure est sans action sur le maltose; je suis loin d'en conclure à la non-existence d'une diastase inversive du maltose, qui, pour nous conformer à notre nomenclature, porterait le nom de *maltase*. M. Bourquelot a même indiqué la formation d'une semblable diastase chez l'Aspergillus vivant sur le maltose. Le seul point sur lequel je voudrais attirer l'attention, c'est que lorsqu'on ne sait absolument rien d'une diastase, ni sur les conditions les plus favorables à son action, ni sur celles qu'exige sa production en quantité notable, on ne peut rien conclure d'expériences dans lesquelles on ne l'a pas trouvée. Il me semble qu'à ce point de vue la question de l'assimilation du maltose est tout entière à reprendre; peut-être les faits que j'aurai à mettre en lumière pour la sucrase suggéreront-ils quelque indication sur le sens dans lequel on pourrait chercher à résoudre ce problème.

Comme je le montrerai plus loin, la formation de quantités considérables de sucrase en présence du maltose n'a qu'une relation lointaine ou même nulle avec la présence de ce sucre. Des deux sucres aux dépens desquels j'ai fait vivre la levure

1. *Comptes rendus*, t. 97, 1883, p. 1000 et 1522.

pour étudier la formation de sa sucrase, le maltose et le saccharose, aucun ne semble avoir d'influence bien marquée sur la production de la diastase ; c'est la matière azotée présente dans le milieu de culture qui a sur le phénomène une influence prédominante, devant laquelle toutes les autres disparaissent ; et dès lors nous n'avons plus lieu de nous étonner de voir la sucrase se former en présence d'un sucre sur lequel elle n'agit point, parce qu'il n'y a entre les deux faits aucune relation de cause à effet.

J'ajouterai enfin que j'ai toujours employé, pour faire mes ensemencements, sauf dans quelques cas particuliers que je mentionnerai, de la levure âgée de 24 heures et cultivée dans du moût de bière.

Levure de Tantonville.

J'ai fait, avec cette levure, quatre séries d'expériences ; dans deux séries, je cultivais la levure en surface, dans des fioles à courant d'air renfermant du moût de bière ; dans les deux autres séries, la levure a été cultivée en profondeur dans le même milieu. Dans chaque série, j'ai mis en expérience un nombre pair de vases de culture, à la température de 20° environ ; je retirais toujours en même temps de l'étuve deux de ces vases, dont l'un fournissait la levure destinée à être épuisée par l'eau, et l'autre, aussi identique que possible au premier, servait à déterminer le poids de levure. Je déterminais ce poids en recueillant la levure sur un filtre taré et la séchant à 100°. Avec les autres levures que j'étudierai plus loin, j'ai toujours procédé de la même manière. Les résultats de ces quatre séries d'expériences sont résumés dans le tableau suivant.

Sucrase chez la levure de Tantonville.

SÉRIES	DURÉE EN JOURS	MALTOSE CONSOMMÉ	ACIDITÉ	POIDS DE LEVURE	SUCRASE DU LIQUIDE	SUCRASE DES CELLULES							SUCRASE TOTALE
						I	II	III	IV	V	VI	TOTAL	
I	2	0,72	36	0,071	5,5	3,7	3,3	0,5	0	»	»	7,5	13,0
	3	1,72	49	0,108	8,6	5,1	9,6	2.4	1,2	0,7	0,5	19,5	28,1
	4	2,48	41	0,142	10,0	4,0	8,0	13,7	2,3	0,9	0,4	29,3	39,3
	5	3,12	50	0,135	11,5	4,0	13,5	12,8	1,8	»	»	32,1	43,6
	6	»	35	»	13,9	3,7	9,1	13,1	2,1	1,0	»	29,0	42,9
II	1,5	0,14	15	0,034	3,4	1,6	0,5	0,1	»	»	»	2,2	5,6
	2,5	0,70	13	0,052	6,9	0,2	3,9	0,6	0,3	»	»	10,0	16,9
	3,5	0,96	20	0,068	7,7	4,5	11,0	5,3	1,7	0,7	»	23,2	30.9
	5,5	1,28	20	»	8,5	5,6	6,5	2,9	1,0	1,0	»	16,7	25,2
III	2	1,8	41	0,150	17	8,7	13,4	4,3	0,5	0,5	»	27,4	44,4
	3	2,3	35	0,160	19	6,5	9,0	9,7	1,4	»	»	26,6	45,6
	5	2,5	43	0,143	23	3,6	12,5	7,0	0,9	0,6	»	24,6	47,6
	7	»	41	0,121	22	1,7	12,3	6,9	0,7	0,2	»	21,8	43,8
	9	»	41	»	25.3	4,8	10,6	3,5	0,8	0,2	»	19.9	45,2
IV	1,5	0,74	22	0,097	9,2	5,2	8,7	2,4	0,3	»	»	16,6	25,8
	2,5	1,13	24	0,099	10,1	5,5	7.6	1,1	0,3	»	»	14,5	24,6
	3,5	1,28	20	0,089	10,1	5,1	6,5	1.9	0.3	»	»	13,8	23,9
	4,5	»	20	0,084	10,0	3,4	7,3	3,7	0,3	»	»	14.3	24.3
	6,5	»	20	0,075	10,7	4,7	5,2	1,2	0,4	»	»	11,5	22,2

Tableau I.

Voici quelques détails explicatifs qui complètent ce tableau. Les cultures des séries I et II ont été faites en profondeur, dans des vases presque entièrement remplis par le moût et renfermant respectivement 50^{cc} et 20^{cc} de liquide, 3^{gr},12 et 1^{gr},28 de maltose, 20 milligrammes et 5 milligrammes d'acide libre exprimé en acide tartrique. Dans les expériences des séries III et IV, faites dans des fioles à fond plat, à courant d'air, il y avait respectivement 40^{cc} et 20^{cc} de moût renfermant 2^{gr},5 et 1^{gr},28 de maltose, 17 milligrammes et 5 milligrammes d'acide tartrique. La semence employée était la même pour I et III et pour II et IV.

L'acidité qui, comme on le voit en comparant les chiffres du tableau à ceux que je viens de donner, subit des variations faibles, n'est pas très importante à considérer en elle-même pour le sujet qui nous occupe ; cependant, elle a de l'importance au point de vue du dosage de la sucrase présente dans le liquide de culture, qu'il faut pouvoir neutraliser aussi exactement que possible avant l'addition de la dose d'acide acétique la plus favorable à l'interversion. Je l'ai déterminée avec de l'eau de chaux, en ayant soin de débarrasser les liquides provenant des cultures

en profondeur de leur acide carbonique par une exposition de quelques minutes dans le vide. Elle est toujours exprimée dans le tableau en milligrammes d'acide tartrique. L'avant-dernière colonne donne la quantité totale de sucrase des cellules; les chiffres qu'elle renferme sont les sommes des chiffres trouvés dans les dosages partiels, après chaque épuisement de la levure par l'eau. Ces chiffres relatifs aux dosages partiels n'ont pas d'ailleurs d'autre intérêt que de montrer la marche du dosage, et je les omettrai dans l'exposé des autres expériences. La signification des chiffres des autres colonnes est suffisamment expliquée par les tableaux analogues que j'ai donnés dans l'étude de l'Aspergillus Niger pour que je puisse me dispenser d'insister davantage.

Avant d'aborder l'examen de la sucrase, objet principal de cette étude, nous pouvons noter en passant quelques faits dignes de remarque. Dans les séries I, III et IV, nous voyons que le poids de levure produite va en augmentant, puis en diminuant ; je donnerai plus loin d'autres exemples de cette diminution de poids. Le moment où ce poids passe par son maximum ne coïncide pas avec la consommation totale du sucre; il précède de quelque temps la disparition de cette matière alimentaire, et la diminution commence, sans aucun doute, au moment où l'augmentation de poids due à la formation de nouvelles cellules ne compense plus la diminution de poids provenant de la disparition des réserves nutritives des cellules formées les premières. Ce fait est d'accord avec ce que l'on savait déjà dans cet ordre d'idées ; les poids de récoltes obtenues avec une même levure, dans des conditions diverses, ne peuvent donner qu'une idée approximative de l'influence de ces conditions.

A cette diminution sensible du poids de la levure correspond une apparition de plus en plus abondante de la sucrase dans le milieu de culture. Cette augmentation, notable pour les séries I, II et même III, est à peine appréciable pour la série IV. Je rappelle que les deux dernières séries diffèrent des premières en ce que les fioles de culture renferment une couche assez mince de liquide et sont traversées par un courant d'air. Le courant d'air, dont j'ai déjà fait entrevoir l'influence à propos de l'Aspergillus, joue ici un rôle analogue dans l'oxydation de la sucrase, oxydation dont je donnerai plus loin la preuve expérimentale.

Cette oxydation est d'autant plus facile que le liquide est en couche plus mince : dans la série IV, où l'épaisseur du liquide est sensiblement la moitié de celle qu'il occupe dans les vases de la série III, la quantité de sucrase du liquide va en augmentant très peu, et cependant la quantité de sucrase des cellules va en diminuant à peu près de la même manière par suite de sa diffusion.

L'oxydation qui intervient ici rend incertaine, comme je l'avais fait prévoir plus haut, toute conclusion relativement à l'influence de la vie aérobie ou de la vie anaérobie sur la formation de la sucrase. Si, en effet, nous comparons l'expérience II à l'expérience IV, et je prends ces deux séries parce que les cultures ont été faites avec la même semence et que tout y est identique, à l'aération près, nous voyons que dans la série II, bien que le poids de levure récoltée soit beaucoup moindre que dans la série IV, le chiffre maximum de la quantité totale de sucrase est plus considérable. Mais dans la seconde de ces séries ce chiffre est diminué d'une manière notable par suite de l'oxydation. Cette vie aérobie a un autre effet que je signale en passant : c'est d'amener plus rapidement le vieillissement de la levure, en rendant sa vie plus active, et, comme la diffusion de la sucrase est corrélative de ce vieillissement et d'une consommation de réserves, de diminuer plus rapidement la quantité de sucrase renfermée dans les cellules, le maximum de cette sucrase se rapprochant de l'origine de la culture. Aussi, le raisonnement que je faisais tout à l'heure, en comparant les quantités maximum de sucrase aux quantités maximum de levure récoltée dans les deux modes d'existence de cet organisme, n'a-t-il de valeur que parce qu'il nous a permis de fixer un instant les idées ; en réalité, le phénomène a une allure beaucoup plus complexe, qui fait que les poids de levure ne peuvent pas être pris en considération. Pour ne parler que de la vie anaérobie, dans laquelle les phénomènes d'oxydation sont négligeables, comme je le montrerai, tant qu'il y a du sucre à consommer, la quantité de sucrase n'est nullement proportionnelle au poids de levure formée, pas plus que ce poids de levure n'est lui-même proportionnel au poids de matière alimentaire consommée.

On voit combien est mouvant le terrain sur lequel nous avons à appuyer nos conclusions et quelle complexité présente

la formation de la sucrase lorsqu'on veut la mettre en relation avec les autres phénomènes de la vie de la levure. Bornons-nous donc à établir les conclusions générales qu'on peut, sans s'aventurer trop loin, tirer de l'examen du tableau I. Pour la vie anaérobie, la quantité totale de sucrase croît jusqu'à un maximum pour décroître ensuite : cette quantité totale est la somme de la sucrase du liquide et de la sucrase des cellules, la première croissant régulièrement par suite d'apports successifs qui lui viennent de la seconde ; cette dernière va elle-même en croissant à mesure que le poids de levure augmente, pour diminuer ensuite. On conçoit immédiatement quelle place ce gain dans la quantité de sucrase des cellules, qui s'accompagne toujours d'une perte résultant d'un passage à l'extérieur, peut laisser aux variations dans la situation du maximun, variations qui sont sous la dépendance aussi bien de l'élaboration de quantités de sucrase nouvelles que de la diffusion plus ou moins facile de la diastase déjà formée. Quant à la vie aérobie, elle nous rapproche de l'Aspergillus : pour la levure comme pour cette mucédinée, la sucrase qui va en augmentant dans le liquide de culture va en diminuant dans les cellules à partir d'une époque très rapprochée de l'origine de la culture ; et comme, pour la levure, l'oxydation semble indubitablement la cause la plus nette de cette diminution, nous n'avons aucune raison pour ne pas étendre à l'Aspergillus, organisme foncièrement aérobie, cette même cause de diminution de la sucrase totale. C'est d'ailleurs à un phénomène de destruction incomplètement compensée par une formation de sucrase nouvelle que j'avais attribué l'existence d'un maximum de sucrase dès le début de la culture. Je ferai remarquer que cette explication ne s'applique pour la levure qu'à sa vie aérobie, et que, comme nous le verrons, les phénomènes d'oxydation n'interviennent dans la vie anaérobie que lorsque tout le sucre a disparu et que le liquide de culture a pu se débarrasser peu à peu de l'acide carbonique qui le saturait et le protégeait contre cette intervention de l'oxygène. Si j'insiste sur cette circonstance, c'est que nous trouverons bientôt un cas où il nous faudra recourir, pour un fait analogue à ceux que je viens d'exposer, à une explication différente.

Levure de pale-ale.

La cause d'erreur provenant de l'oxydation, sur laquelle j'ai insisté plus haut, m'a décidé à renoncer aux cultures en surface et avec courant d'air pour l'étude de la sucrase, et à ne plus faire que des cultures en profondeur dans un milieu qui est rapidement privé d'oxygène par le dégagement d'acide carbonique dont il est le siège. La levure de pale-ale m'a fourni les résultats suivants, par la culture dans des fioles renfermant chacune, dans 50^{cc} de moût, $5^{gr},12$ de maltose et 11 milligrammes d'acide exprimé en acide tartrique. J'ai omis à dessein dans ce tableau les résultats relatifs aux épuisements partiels de la levure par l'eau, parce qu'ils ne nous apprendraient rien de plus que ceux que j'ai donnés dans le tableau I.

Sucrase chez la levure de pale-ale.

DURÉE EN HEURES	MALTOSE CONSOMMÉ	ACIDITÉ	POIDS DE LEVURE	POIDS DE LEV. APRÈS MACÉRATION	DIMINUTION DU POIDS DE LEVURE	SUCRASE DU LIQUIDE	SUCRASE DES CELLULES	SUCRASE TOTALE
42 heures. . . .	1,78	42	0,127	0,023	0,104	3,5	13,3	16,8
69 »	2,86	49	0,141	0,031	0,110	3,8	14,4	18,2
48 h. plus tard.	4,54	53	0,201	0,050	0,151	6,2	12,2	18,4
48 »	5,12	45	0,198	0,045	0,153	8,2	11,1	19,3
48 »	»	44	0,182	0,050	0,126	6,3	9,6	15,9

Tableau II.

On pourrait d'abord remarquer, en comparant ce tableau au précédent, que la levure de pale-ale est un producteur de sucrase beaucoup moins énergique que la levure de Tantonville, bien qu'ici le poids de levure formée soit plus élevé, tout en l'étant beaucoup moins que ne le comporterait la proportionnalité au sucre consommé, si elle existait. Cependant, tout en faisant les réserves que j'ai déjà exposées relativement à la comparaison entre la quantité de sucrase et le poids de levure obtenue, j'ai encore à signaler une autre raison qui m'empêche de tirer une conclusion de la comparaison des deux séries d'expériences : c'est que les deux expériences sont difficilement comparables. Il m'est en effet arrivé, avec l'Aspergillus, d'observer, dans des expériences dont les conditions étaient tout à fait identiques, sauf que la semence employée n'était pas la même, des varia-

tions considérables dans les quantités de sucrase produite, et de trouver des chiffres dont le rapport était celui de 3 à 5. Quelle que soit la cause de cette variation, que je serais porté à attribuer à la nature de la semence, puisqu'elle ne se produit pas dans le cas où la semence employée est la même, nous devons cependant en conclure que si, avec un même être, d'une série d'expériences à l'autre, la comparaison n'est pas possible, elle serait encore plus aventurée lorsqu'il s'agit d'êtres différents.

A l'inspection du tableau II, nous voyons que la marche de la formation de la sucrase et de sa diffusion est à peu près la même que pour la levure de Tantonville, placée dans les mêmes conditions; nous constatons de plus la diminution, dont j'ai parlé, dans le liquide de culture à partir du moment où la consommation du sucre est complète. Cette diminution est bien due à une oxydation, car si on expose le liquide de culture à une cause d'oxydation énergique, comme l'influence de la lumière solaire, on voit la diminution suivre une marche bien plus rapide que dans les conditions normales. C'est ainsi que j'ai vu, dans un cas, le pouvoir inversif du liquide tomber à la moitié de sa valeur après six heures d'insolation.

Les autres observations que j'ai faites pour la vie anaérobie de la levure de Tantonville s'appliquent également ici; je voudrais cependant en ajouter une qui ne manque pas d'importance et que le poids relativement élevé des récoltes de levure m'a permis de suivre de près. Si nous examinons la colonne qui suit celle où se trouvent notés les poids de levure récoltée, et qui indique à quel poids cette levure s'est réduite en macérant dans l'eau jusqu'au moment où elle ne perdait plus de sucrase, nous voyons que la levure a subi des diminutions de poids considérables; ainsi elle s'est réduite dans la première expérience à moins du cinquième de son poids primitif, dans la deuxième à moins du quart, dans la troisième au quart. De plus, les chiffres qui expriment la diminution de poids de la levure suivent les mêmes variations que ceux qui expriment la quantité totale de sucrase. Nous retrouvons là un fait analogue à celui que nous avions vu pour l'Arpergillus, mais nous en avons ici une preuve numérique qui nous échappait alors : la quantité de sucrase présente dans l'intérieur des cellules est en relation avec le poids des autres matériaux accumulés dans ces cellules. J'ajou-

terai qu'en perdant ainsi de sa substance, la levure perd de son azote une proportion considérable, qui peut s'élever jusqu'à près de la moitié de l'azote primitif. Mais je dois me borner à cette indication générale, parce que je touche là à une question à la fois trop importante et trop délicate pour que j'aie pu en faire autre chose qu'une ébauche grossière ; j'aurai d'ailleurs à signaler plus loin, comme je l'ai fait prévoir dans les pages qui précèdent, la relation étroite qui lie la formation de sucrase avec l'alimentation azotée de la levure.

Saccharomyces Pastorianus.

Les expériences ont été conduites comme les précédentes, avec 50^{cc} de moût de bière dans chaque fiole. Ces 50^{cc} renfermaient $3^{gr},26$ de maltose et 16 milligrammes d'acide libre évalué en acide tartrique. Le tableau suivant résume les résultats obtenus.

Sucrase chez le Saccharomyces Pastorianus.

DURÉE EN JOURS	MALTOSE CONSOMMÉ	ACIDITÉ	POIDS DE LEVURE	SUCRASE DU LIQUIDE	SUCRASE DES CELLULES	SUCRASE TOTALE
2	1,88	44	0,081	8,0	14,6	22,6
3	2,38	49	0,083	8,4	8,9	17,3
4	2,48	41	0,103	10,4	6,3	16,7
6	3,26	38	0,075	10,9	6,4	17,3
8	»	38	0,070	10,2	2,7	12,9

Tableau III.

La diminution du poids de la levure avant la disparition complète du sucre est très nette ici. On voit de plus que nous nous rapprochons beaucoup de la marche de la formation de sucrase observée chez l'Aspergillus : pendant que la sucrase du liquide de culture va en augmentant très lentement, celle que renferment les cellules va en diminuant notablement depuis l'origine, de telle sorte que le maximum de la sucrase, aussi bien dans les cellules que dans la totalité, est placé à l'origine de la culture. La diminution finale est bien exagérée, à la vérité, par suite de l'oxydation dont nous avons trouvé un exemple net chez la levure de pale-ale, mais il y a une autre cause qui me semble intervenir encore plus activement pour produire cette diminution ; nous ne sommes pas encore préparés à saisir son influence que nous retrouverons plus loin.

IV

ÉTUDE DE LA FORMATION DE LA SUCRASE CHEZ QUELQUES LEVURES VIVANT AUX DÉPENS DU SUCRE DE CANNE.

Jusqu'ici, nous n'avons cultivé nos levures que dans le moût de bière; nous sommes ramené actuellement à voir si la formation de sucrase s'accomplira de la même manière dans un moût à saccharose. *A priori*, il semblerait tout naturel de penser que, si une levure fabrique de la sucrase en quantité notable dans un moût à maltose, elle doit en produire au moins autant dans un moût à saccharose, la sucrase lui étant indispensable dans le second cas et lui étant inutile dans le premier. J'ai déjà fait entrevoir ce qu'une semblable déduction a d'inexact; je dois maintenant expliquer d'une manière plus précise les différences qu'on observe lorsqu'on passe d'un milieu à l'autre. Il est probable qu'on peut réaliser des conditions générales dans lesquelles toute levure qui donne de la sucrase dans un milieu à maltose en donnera une quantité de même ordre en présence du saccharose; je donnerai même quelques exemples de cas dans lesquels j'ai réalisé ces conditions; mais, bien que j'aie étudié divers milieux de culture, je n'ai pas résolu la question d'une manière générale et j'ai presque toujours observé, pour la plupart des levures que j'ai étudiées, une formation de sucrase beaucoup moins abondante dans les milieux à saccharose que dans le moût de bière. Comme d'autre part je me suis assuré, on en trouvera plus loin la preuve, que ce n'est pas la nature du sucre, maltose ou saccharose, qui joue un rôle dans la formation de la sucrase, je voudrais mettre ceux qui me liront en garde contre une déduction présentant un caractère de généralité, comme celle dont je parlais plus haut. On s'est en effet habitué à mettre en relation la vie de la levure avec la nature du sucre qu'elle consomme, et cette association naturelle des deux idées doit disparaître lorsqu'on envisage la formation de sucrase. Cette formation est sous la dépendance d'autres conditions qui, comme je le montrerai, semblent spéciales et différentes pour chaque levure, de telle sorte que, jusqu'à plus ample informé, toute affirmation générale serait aventurée.

Cela posé, nous pouvons passer à l'étude de la formation de sucrase dans un moût à saccharose. Le liquide qui m'a servi tout d'abord est l'eau de touraillons à 1 ou 2 0/0, liquide à peu près neutre, dans lequel les levures se cultivent bien, quoique moins abondamment que dans le moût de bière. Nous allons voir cependant que les quantités de levure qu'on récolte dans ce milieu restant comparables à celles qui se produisent dans le moût de bière, les quantités de sucrase sont malgré cela bien moins élevées. Je n'ai étudié d'une manière suivie que le Saccharomyces Pastorianus, qui a donné les résultats suivants ;

Sucrase chez le Sacch. Pastorianus.

Eau de tour. sucrée neutre, 50cc. — Saccharose, 4gr,85.

DURÉE EN JOURS	SUCRE INT. RESTANT	SACCHAROSE RESTANT	SUCRE CONSOMMÉ	ACIDITÉ	POIDS DE LEVURE	POIDS APRÈS MACÉRATION	SUCRASE DU LIQUIDE	SUCRASE DES CELLULES	SUCRASE TOTALE
2	3,06	0,58	1,21	41	0,061	0,019	2,0	1,8	3,8
4	1,54	0,12	3,19	174	0,088	0,031	1,5	1,6	3,1
6	0,32	0,0	4,53	190	0,073	0,039	1,5	2,0	3,5
7	0,0	»	4,85	203	0,073	0,034	1,6	1,6	3,2
10	»	»	».	203	0,069	0,049	1,6	0,5	2,1

Tableau IV.

On voit que, d'une manière générale, la marche de la formation de la sucrase est la même que dans le moût de bière; mais c'est surtout sur la petite quantité de sucrase produite que je veux attirer l'attention, car, pour l'appréciation de la sucrase des cellules, les dosages partiels portent sur des quantités trop faibles pour que je puisse répondre de l'exactitude du total à plus d'une demi-unité près. Je ferai aussi remarquer en passant que l'acidité du milieu augmente beaucoup plus que dans le moût de bière. J'ai constaté que cette augmentation d'acidité est due en majeure partie à la formation d'acides fixes, très probablement d'acide succinique. Dans son mémoire sur la fermentation alcoolique, M. Pasteur a montré que cette quantité d'acide succinique peut varier notablement avec la nature du sucre fermentescible; je n'insiste donc pas davantage sur ce fait, parce que je n'ai pas eu le loisir de l'examiner de plus près comme il le mériterait.

Le *Saccharomyces Pastorianus* n'est pas la seule levure qui nous donne un exemple de production très faible de sucrase quand on la cultive dans l'eau de touraillons sucrée. La levure de Tantonville se comporte de même ; j'ai de plus élucidé avec cette levure l'influence que peut avoir la nature de la semence employée. J'avais déjà songé, dans l'expérience que j'ai faite plus haut avec le *Saccharomyces Pastorianus*, à l'objection qu'on aurait pu me faire relativement à cette influence : la différence observée entre le moût de bière et l'eau de touraillons sucrée pouvait tenir à ce fait que la levure qui a vécu dans le premier milieu s'adapte difficilement au second, et subit, à cause du changement brusque, à l'origine de sa culture dans l'eau de touraillons sucrée, une transformation de ses propriétés diastasigènes. Aussi ai-je employé comme semence, dans l'expérience du tableau IV, du *Saccharomyces Pastorianus* qui avait vécu pendant un grand nombre de générations successives dans l'eau de touraillons sucrée neutre. On va voir d'ailleurs que cette influence de la nature de la semence, si toutefois elle existe dans le cas qui nous occupe, disparaît totalement derrière une autre cause bien plus importante de variation dans la fonction diastasigène.

J'ai mis en train avec la *levure de Tantonville*, dans 8 fioles deux à deux identiques, 4 expériences faites dans les conditions suivantes :

A 50cc de moût de bière, renfermant 5gr,3 de maltose. Semence : culture de 40 heures, moût de bière.

B 50cc eau de tour. neutre, renfermant 5gr,3 de saccharose. Semence : culture de 40 heures, moût de bière.

C 50cc eau de tour. neutre, renfermant 5gr,3 de saccharose. Semence : culture de 40 heures, eau de tour. sucrée.

D 50cc eau de tour. neutre, renfermant 5gr,3 de saccharose. Semence : culture de 40 heures, eau de tour. sucrée.

Voici les résultats que j'ai obtenus après 4 jours de culture :

	Sucre cons.	Acidité.	Poids de levure.	Sucrase du liquide.	Sucrase des cellules.	Sucrase totale.
A	3,56	22	0gr,202	8,5	18,9	27,4
B	3,05	62	0gr,066	0,8	0,9	1,7
C	3,34	65	0gr,074	0,8	0,8	1,6
D	3,39	65	0gr,069	0,4	0,6	1,0

Avec la *levure de pale-ale*, j'ai obtenu un résultat analogue,

encore plus défavorable pour la culture dans l'eau de touraillons sucrée. Je n'ai fait que deux cultures correspondant aux expériences A et B de la série précédente, en prenant comme semence de la levure âgée de 24 heures, cultivée dans du moût de bière. J'ai trouvé les résultats suivants après 5 jours de culture :

	Sucre cons.	Acidité.	Poids de levure.	Sucrase du liquide.	Sucrase des cellules.	Sucrase totale.
A	3,75	71	0,165	4,5	17,7	22,2
B	3,41	78	0,098	0,5	traces indosables	0,5

Nous voilà donc en présence d'une levure qui, dans le moût de bière, fournit une quantité de sucrase notable, et qui dans l'eau de touraillons sucrée n'en donne que des traces. Avant de chercher l'explication de cette différence, nous pouvons examiner le fait en lui-même, qui, en dehors de toute interprétation, présente un caractère de généralité assez grand pour que nous puissions en tirer quelques conclusions d'ordre général. Il existe dans la science un grand nombre de faits qui montrent la variabilité de la fonction diastasigène chez quelques êtres autres que la levure. M. Duclaux[1], en particulier, a fait voir que, chez l'Aspergillus Glaucus et le Penicillium Glaucum, cette formation de diastases est en relation étroite avec le mode d'alimentation et ne doit nullement être considérée comme une propriété physiologique fondamentale de la cellule. MM. Brown et Morris ont montré aussi, dans un travail récent[2], les variations que peut subir la sécrétion de diastases chez l'embryon de l'orge, suivant son mode d'alimentation. Nous nous trouvons conduit ici à la même conclusion, à savoir qu'on peut produire une culture relativement florissante de levure indépendamment de la formation de sucrase, et sans que ce changement considérable dans les produits de sécrétion de la cellule soit accompagné d'une modification sensible de ses fonctions physiologiques. La formation de diastases pathogènes par certains microbes doit, de même, pouvoir subir, suivant les conditions de la nutrition de ces microbes, des variations analogues à celles que nous venons de mettre en lumière, et ces variations pourraient peut-être expliquer, dans une certaine mesure, le mécanisme de l'atténuation ou de l'exaltation de la virulence.

1. *Microbiologie*, p. 192 et suivantes.
2. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1890, p. 607.

Il nous semble, en outre, en nous plaçant à un autre point de vue, que la classification souvent adoptée des êtres inférieurs et, en particulier, des levures en cellules inversives et en cellules non inversives, ne saurait désormais être conservée sans être en désaccord avec les faits. On ne doit pas dire : telle cellule est inversive ou ne l'est pas, pas plus qu'on ne peut dire qu'une substance est antiseptique ou ne l'est pas ; il faut encore spécifier très nettement les conditions dans lesquelles on a observé la formation ou l'absence de sucrase, parce qu'il est impossible de dire *a priori* si un être qui jusque-là s'est montré producteur très médiocre de sucrase n'en formera pas une quantité considérable si l'on vient à changer tant soit peu son mode d'alimentation.

C'est de ce dernier point que je voudrais maintenant donner une démonstration expérimentale, en examinant quelques-unes des circonstances qui peuvent favoriser ou entraver la formation de sucrase chez la levure.

V

DE DIVERSES CIRCONSTANCES QUI INFLUENT SUR LA FORMATION DE LA SUCRASE CHEZ LA LEVURE.

J'ai dit plus haut que la nature du sucre qui sert d'aliment principal à la levure ne semble avoir qu'une influence médiocre sur la formation de la sucrase. Je ne voudrais cependant pas présenter ce fait sous une forme trop générale, parce que je n'ai étudié jusqu'ici que l'influence de deux sucres, le maltose et le saccharose. L'expérience m'a montré que l'eau de touraillons, qui, sucrée avec saccharose, ne permet à la levure d'élaborer que des quantités très faibles de sucrase, ne devient pas plus favorable à cette formation lorsqu'on l'additionne de maltose. A 50^{cc} d'eau de touraillons à 2 0/0 j'ai ajouté, d'une part, 5 grammes de maltose pur (A), d'autre part 5 grammes de saccharose (B), et j'ai ensemencé ces deux milieux avec de la levure de Tantonville, âgée de 36 heures, cultivée dans du moût de bière. Après 5 jours de culture, j'ai trouvé les résultats suivants :

	Sucre cons.	Acidité.	Poids de levure.	Sucrase du liquide.	Sucrase des cellules.	Sucrase totale.
A	4^{gr},5	98	0^{gr},164	0,6	0,9	1,5
B	4^{gr},4	90	0^{gr},121	0,9	2,5	3.4

La seule différence qu'on observe entre les deux expériences, c'est que le poids de levure formée aux dépens du maltose est plus élevé que celui qui se forme aux dépens du saccharose ; cette différence, qui s'était déjà présentée à nous dans les cultures faites dans le moût de bière, ne fait qu'exagérer la production plus forte de sucrase observée dans le milieu à saccharose. Mais les dosages de quantités aussi faibles de sucrase ne peuvent conduire à des chiffes très précis. Je me borne à tirer de l'expérience la conclusion que j'annonçais tout à l'heure, à savoir que, lorsque les autres conditions sont défavorables à la formation de sucrase, la nature du sucre est sans influence bien sensible sur la production de cette diastase.

La variation de la nature du sucre présent ne nous fournissant pas la solution de la question que nous nous étions posée, nous sommes conduit tout naturellement à attribuer les différences que nous avons observées en passant d'un milieu à l'autre à la différence que ces milieux présentent dans la nature de la matière alimentaire qui accompagne le sucre. Parmi ces matériaux, le plus important est sans contredit l'azote, et c'est sur lui que devront porter nos investigations. Je vais essayer de montrer que la formation de sucrase chez la levure est en relation étroite avec l'azote qu'on donne à cette levure comme matière alimentaire. On conçoit dès lors la complexité que revêt le problème que nous nous étions proposé ; et, ainsi qu'il arrive dans toute espèce de problème, nous sommes conduit à remplacer une question par une autre, que nous formulerons de la manière suivante : Sous quelle forme faut-il offrir l'azote à la levure pour que, en consommant une quantité de sucre déterminée, elle produise la quantité de sucrase la plus grande possible ? Essayer de résoudre ce problème dans son ensemble m'eût certainement entraîné bien loin de la question du dosage de la sucrase que j'ai cherché à élucider dans ce travail. J'ai dû me borner, comme je l'ai dit en commençant, à établir quelques points particuliers, que je vais exposer en terminant.

J'ai parlé à dessein dans ce qui précède de la *nature* de l'azote et non de sa *quantité*. La quantité d'azote de l'eau de touraillons apparaît, en effet, comme étant suffisante, car il en reste encore une quantité notable après la culture, et de plus, la levure

qui s'est développée dans ce milieu renferme autant d'azote que celle qui sort du moût de bière. A défaut de *quantité* ce doit donc être la *qualité* de l'azote que nous avons à mettre en cause. Voici l'exemple de quelques cas dans lesquels l'influence de cette qualité de l'azote apparaît nettement.

J'ai été conduit à essayer à ce point de vue l'eau de levure, préparée en faisant bouillir de la levure avec de l'eau. L'eau de levure que j'ai employée a été préparée avec de la levure de Tantonville. Dans des fioles renfermant 50^{cc} de cette eau de levure neutre (à 5 0/0 de levure) avec 5 grammes de saccharose, j'ai ensemencé de la levure de Tantonville, âgée de 24 heures, cultivée dans un moût de bière. J'ai obtenu les résultats suivants :

Durée en jours	Sucre int. restant	Sucre total restant	Sucre consommé	Acidité	Poids de levure	Sucrase du liquide	Sucrase des cellules	Sucrase total
1	2,2	4,58	0,42	43	0,031	2,3	6,4	8,7
3	2,11	2,11	2,89	78	0,104	2,6	20,7	25,3
5	1,02	1,02	3,98	66	0,085	4,2	18,5	22,7
7	0,24	0,24	4,76	52		7,6	26,5	34,1

Tableau V.

On voit que la quantité de sucrase, très faible dans l'eau de touraillons, devient dans l'eau de levure tout à fait comparable à la quantité obtenue dans le moût de bière. J'ai constaté, et je le note en passant, que la quantité d'azote organique renfermée dans cette eau de levure est à peu près la même que celle que renferme l'eau de touraillons, ce qui appuie notre conclusion relative à la qualité de l'azote.

L'eau de touraillons qui, comme je viens de le rappeler, est défavorable à la formation de la sucrase, devient au contraire éminemment propre à sa production, si on l'additionne de peptone. Voici deux expériences dans lesquelles j'ai cultivé de la levure de Tantonville dans de l'eau de touraillons à 2 0/0, additionnée de 2 0/0 de peptone et, dans une expérience (A) de maltose, dans l'autre (B) de saccharose; au bout de 5 jours, j'ai trouvé les résultats qui suivent :

	Sucre primitif	Sucre cons.	Acidité	Poids de levure	Sucrase du liquide	Sucrase des cellules	Sucrase totale
A	4^{gr},81	3,86	52	0^{gr},154	16,3	42,9	59,2
B	5 ,14	4,44	52	0 ,140	5,8	42,5	48,3

Ici, le milieu à maltose se montre beaucoup plus favorable à la formation de sucrase que le moût de bière lui-même ; il fournit aussi plus de sucrase que le milieu à saccharose ; c'est l'inverse de ce que nous avions vu dans une expérience précédente. Mais, indépendamment des réserves que j'ai faites à ce propos, il peut fort bien se faire que lorsque les conditions d'alimentation azotée sont favorables à la formation de sucrase, l'influence de la nature du sucre se fasse sentir et le maltose prenne le pas sur le saccharose.

J'ajouterai enfin que j'ai essayé, dans l'eau de levure, qui se montre si favorable à la formation de sucrase, l'influence de l'addition d'un sel d'ammoniaque, J'ai fait deux cultures comparatives de levure de Tantonville, l'une (A) en présence de 1 0/0 de phosphate d'ammoniaque, l'autre (B) sans phosphate. Il y avait à l'origine 5 grammes de saccharose ; après 5 jours, j'ai trouvé les résultats suivants :

	Sucre cons.	Poids de levure.	Sucrase du liquide.	Sucrase des cellules.	Sucrase totale.
A	4gr,73	0gr,110	2,6	37,2	39,8
B	4 ,2	0 ,061	7,7	45,0	52,7

On voit que si la présence de phosphate augmente notablement le rendement en levure, par contre elle a une influence nuisible sur l'élaboration de la sucrase. On remarquera que dans l'expérience B j'ai obtenu une quantité de sucrase notablement plus élevée qne dans le tableau V ; c'est qu'ici l'eau de levure employée était à 8 0/0 de levure, au lieu de 5 0/0. Si l'on tient compte de cette différence, on y trouvera une confirmation de plus de l'influence de la nature de l'azote alimentaire ; la variation de cet azote n'a porté ici que sur sa quantité, l'eau de levure étant préparée avec la même levure dans les deux cas, et les chiffres relatifs à la sucrase sont très sensiblement dans le rapport de 8 à 5, chiffres qui représentent proportionnellement les quantités de levure employées à la préparation du liquide nutritif.

J'ai noté tout à l'heure que j'avais employé pour préparer l'eau de levure de la levure de Tantonville. Je ne voudrais rien préjuger sur l'importance que peut avoir ce détail, insignifiant en apparence; peut-être n'y a-t-il qu'une simple coïncidence dans

l'expérimentation entre l'emploi de cette eau de levure particulière et les résultats qu'elle a fournis avec la levure de Tantonville. L'emploi de la même eau de levure dans des expériences que j'ai faites avec d'autres levures m'a donné des résultats tout différents. Le tableau suivant résume ces expériences, conduites comme celles du tableau V; la 1re série a été faite avec le *Sacch. Pastorianus*, la 2e avec la *levure de pale-ale* et la 3e avec la *levure de Champagne*.

SÉRIES	DURÉE EN JOURS	SUCRE CONSOMMÉ	ACIDITÉ	POIDS DE LEVURE	SUCRASE DU LIQUIDE	SUCRASE DES CELLULES	SUCRASE TOTALE
I	1	0,42	52	0,043	2,7	3,2	5,9
	3	3,54	66	0,113	3,5	3,0	6,5
	5	4,90	104	0,107	2,4	3,3	5,7
	7	5,0	85	0,098	1,0	2,5	3,5
II	2	1,7	31	0,074	1,3	3,6	4,9
	4	4,0	72	0,140	1,6	2,6	4,2
	6	5,0	52	0,137	2,4	1,7	4,1
	7,5	»	52	0,129	2,5	1,3	3,8
III	2	1,3	52	0,045	1,3	4,3	5,6
	4	2,6	65	0,071	1,4	4,0	5,4
	6	3,8	65	0,085	2,0	3,0	5,0
	7,5	5,0	65	0,067	1,8	2,0	5,8

Tableau VI.

En jetant les yeux sur ce tableau, on voit de suite que l'eau de levure est beaucoup moins favorable à la formation de sucrase pour les trois levures étudiées que pour la levure de Tantonville; elle est cependant préférable à l'eau de touraillons, ainsi que cela apparaît nettement avec le *Sacch. Pastorianus*. Nous retrouvons ici pour ces levures ce que nous avions déjà remarqué précédemment pour cette dernière, un maximum de sucrase à l'origine de la culture, et avec les faits nouveaux qui se sont successivement présentés à nous, nous pouvons donner de ce fait une explication qui est très probablement d'accord avec la réalité des phénomènes. Une levure ne doit être envisagée comme un producteur médiocre de sucrase que parce qu'elle est difficile sur le choix de l'azote qui lui est nécessaire pour fabriquer cette diastase; dans tous les cas où nous avons opéré avec de semblables levures nous n'avons pu leur offrir cet azote qu'en quantité insuffisante, et dès lors, il est naturel de penser que les premières cellules formées ont consommé cet azote à leur profit,

et ont ainsi rendu la formation de sucrase impossible ou très pénible pour les cellules qui se sont développées ensuite.

Nous pouvons de plus tirer des dernières expériences que je viens de citer une conclusion d'un ordre plus général et qui me semble avoir une grande importance. Nous avons vu qu'une eau de levure qui peut servir à une levure déterminée à fabriquer des quantités de sucrase considérables est un aliment diastasigène médiocre pour une autre levure. Cette particularité établit entre les êtres d'un même genre une différence considérable et qui nous mène à cette conclusion que les faits observés dans cet ordre d'idées, pour un organisme déterminé, ne sont valables que pour cet être seul, et ne peuvent nullement s'appliquer à un autre être, quelque voisin qu'il puisse paraître du premier. Peut-être même cette production de diastase pourrait-elle servir dans certaines circonstances à distinguer des organismes qui, à n'envisager que leurs autres caractères, marche de la consommation du sucre, acidification du milieu, poids de cellules vivantes produites, sembleraient difficiles à distinguer. Il ne faudrait pas cependant oublier que cette production de diastases est soumise à une infinité de causes de variation dont quelques-unes s'éclaireront, je crois, d'un jour nouveau à la lumière des faits que je viens d'exposer.

L'étude complète de ces causes de variation présente actuellement un champ immense à nos investigations. Je viens, en effet, de montrer que chaque cellule a besoin d'une étude spéciale, et cette étude ne sera vraiment fructueuse que lorsqu'on aura trouvé les conditions les plus favorables à la production de la diastase. Nous nous trouvons placés devant une question analogue à celle que M. Raulin a si magistralement résolue pour l'Aspergillus Niger; si le rôle de divers éléments dans la végétation de cette mucédinée ne s'est révélé nettement qu'à partir du moment où le milieu de culture le plus favorable à la plante était trouvé, de même l'étude de l'influence de diverses matières alimentaires sur la production d'une diastase par une cellule déterminée ne pourra donner de résultats certains que lorsqu'on sera arrivé à faire produire à cette cellule la quantité de diastase la plus grande possible, cette quantité restant de plus à peu près constante dans des expériences identiques.

Lorsqu'on cherche à pénétrer les détails de leur mécanisme, les phénomènes qui paraissaient d'abord les plus simples ne tardent pas à se compliquer de plus en plus à mesure qu'on les examine de plus près. C'est ainsi qu'en m'adressant, au début de ces recherches, à la diastase dont l'action apparaissait comme la plus simple, la sucrase, j'ai été conduit peu à peu à envisager le phénomène de l'interversion du sucre par cette substance comme dénué de ce caractère de simplicité qu'on lui avait jusque-là attribué. Ce n'est qu'après avoir mis en lumière les circonstances qui peuvent régulariser cette action et en faire un phénomène comparable à lui-même dans les cas les plus divers, que j'ai pu passer à l'étude de la sécrétion de la sucrase par différents êtres. Il ne faut jamais se hâter de tirer des faits particuliers une conclusion plus générale que celle qu'ils comportent ; c'est là une tendance contre laquelle j'ai essayé de réagir dans les pages qui précèdent, en montrant que la fonction diastasigène, si variable quand on passe d'un être à l'autre, l'est encore chez un même être suivant les conditions particulières qui accompagnent son alimentation.

SECONDE THÈSE

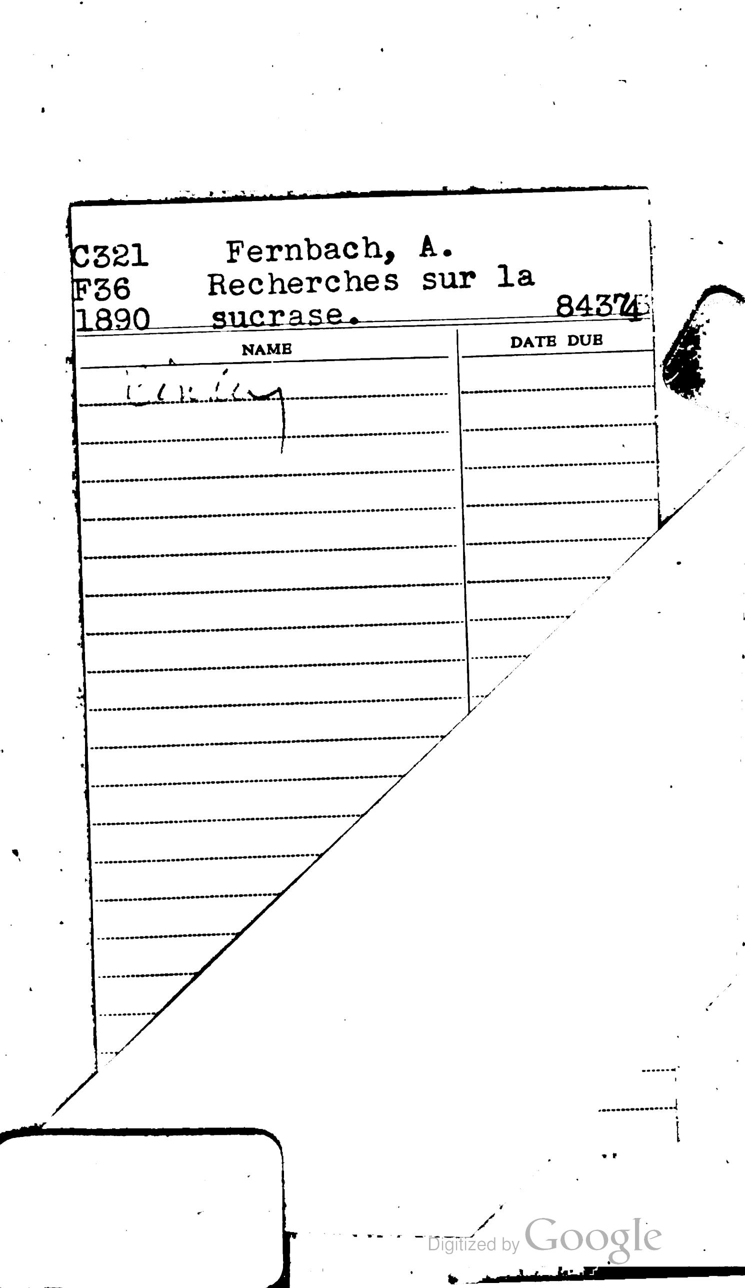
PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

POLARISATION ROTATOIRE

Vu et approuvé :
Paris, le 6 novembre 1890,
LE DOYEN DE LA FACULTÉ DES SCIENCES,
G. DARBOUX.

Vu et permis d'imprimer :
Paris, le 7 novembre 1890,
LE VICE-RECTEUR DE L'ACADÉMIE DE PARIS,
GRÉARD.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et fils.



NAME | DATE DUE

